



Analyses génétiques et moléculaires du locus SKr impliqué dans l'aptitude du blé (*Triticum aestivum* L.) au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L.)

Walid Alfares

► To cite this version:

Walid Alfares. Analyses génétiques et moléculaires du locus SKr impliqué dans l'aptitude du blé (*Triticum aestivum* L.) au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L.). Génétique des plantes. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21984 . tel-00724743

HAL Id: tel-00724743

<https://theses.hal.science/tel-00724743>

Submitted on 22 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université BLAISE PASCAL

N° D.U. 1984

Université d'Auvergne

Année 2009

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre 513

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire Végétale)

Soutenue le 4 décembre 2009

Walid ALFARES

**Analyses génétiques et moléculaires du locus *SKr* impliqué dans
l'aptitude du blé (*Triticum aestivum* L.) au croisement avec le
seigle (*Secale cereale* L.)**

JURY

Président	Said MOUZEYAR	PR, Université Blaise Pascal
Rapporteurs	Pierre DEVAUX	DR, Florimond Desprez
	Alain GHESQUIERE	DR, IRD
Examineurs	Nabila YAHIAOUI	CR, CIRAD
	Catherine FEUILLET	DR, INRA
	Pierre SOURDILLE	CR, INRA
	Michel BERNARD	DR, INRA

UMR1095 INRA/UBP Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales

Résumé

La plupart de variétés élités de blé tendre ne peuvent pas être croisées avec des espèces apparentées ce qui restreint considérablement la base génétique qui peut être utilisée pour l'introgression de nouveaux allèles dans les programmes de sélection. L'inhibition de l'hybridation entre le blé et les espèces apparentées (e.g. seigle, orge) est génétiquement contrôlée. Un certain nombre de QTLs ont été identifiés à ce jour, y compris les gènes *Kr1* sur le chromosome 5BL et *SKr*, un QTL majeur identifié au laboratoire en 1998 sur le bras court du chromosome 5B, tous deux impliqués dans l'inhibition du croisement entre le blé tendre et le seigle. Dans cette étude, nous avons utilisé une population recombinante SSD provenant d'un croisement entre la variété Courtot non croisable et la lignée MP98 croisable pour caractériser l'effet majeur dominant de *SKr*. Le gène a ensuite été cartographié génétiquement sur la partie distale du chromosome 5BS à proximité du locus GSP (Grain Softness Protein) dont l'homéologue sur le chromosome 5D est impliqué dans la dureté du grain (locus *Ha*). Les relations de colinéarité avec l'orge et le riz ont été utilisées pour saturer la région de *SKr* par de nouveaux marqueurs et établir des relations orthologues avec une région de 54 kb sur le chromosome 12L de riz. Au total, 6 marqueurs moléculaires ont été cartographiés dans un intervalle génétique de 0,3 cM, et 400 kb de contigs physiques de BAC ont été établis des deux côtés du gène afin de jeter les bases du clonage positionnel de *SKr*. De nouvelles populations de grands effectifs ont été développées pour la localisation précise du gène *SKr* sur les cartes génétiques et physiques. 223 individus d'une population HIF (SSD254.14) ont été testés pour leur aptitude au croisement avec le seigle et génotypés avec les marqueurs proches du gène pour confirmer les données obtenues dans la population de départ. Les résultats montrent que *SKr* est localisé dans une région hautement recombinante et que les relations entre distances génétiques et distances physiques sont favorables aux dernières étapes de clonage positionnel du gène. Enfin, deux marqueurs SSR complètement liés au gène *SKr* ont été utilisés pour évaluer une collection de descendance de blé aptes au croisement avec le seigle originaires d'un programme de sélection de triticales primaire. Les résultats confirment l'effet majeur de *SKr* sur l'aptitude au croisement et l'utilité des deux marqueurs pour introgresser l'aptitude au croisement interspécifique dans des variétés élités de blé tendre.

Abstract

Although wheat can be crossed with a wide range of related species, most adapted bread wheat varieties are non-crossable because of the failure of pollen to fertilize the ovary, greatly restricting the germplasm that can be used for alien introgression. Inhibition to crossability between wheat (*Triticum aestivum* L.) and related species such as rye (*Secale cereale* L.) is genetically controlled. A number of QTL have been identified to date, including *Kr1* on chromosome 5BL and *SKr*, a strong QTL mapped previously in our group at the distal end of chromosome 5BS. In this work, we have used 50 recombinant SSD individuals originating from a cross between the poorly crossable cultivar Courtot and the crossable line MP98 to first characterize the effect of *SKr*. Two classes of crossability were observed with a 1:1 segregation as expected for a single major gene in a SSD population after 6 generations of selfing, thereby confirming the major dominant effect of *SKr* on crossability. Additional SSR markers were mapped at the proximal end of the gene on 5BS and new markers were developed from the colinearity with barley and rice. High disruption of colinearity between wheat and rice in the telomeric region of 5BS did not allow to use rice in the first place but the use of a high-density barley EST map allowed us to indentify a new marker at the distal end of *SKr* and establish a syntenic relationship with rice chromosome 12L in the region. New wheat SSR markers were also derived from a BAC sequence carrying the GSP locus that was identify in the vicinity of the *SKr* locus. In total, 6 additional markers were mapped at the *SKr* locus and 400 kb of physical contig were established on both sides of the gene after screening the Chinese Spring BAC library with flanking markers. Sequence comparisons showed that the region spanning *SKr* in wheat corresponds to a 54 kb region carrying 6 genes on rice chromosome 12L. New high-resolution mapping populations have been developped to achieve the map-based cloning of the *SKr* gene. Two SSR markers completely linked to *SKr* were further used to evaluate a collection of crossable wheat progenies originating from a primary triticales program developed in the institute. High association was observed between the crossability and the alleles from the crossable lines at the *SKr* locus. This confirmed the major effect of *SKr* on crossability in wheat and provided very useful markers for the efficient introgression of *SKr* alleles in elite varieties to increase genetic diversity in wheat and triticales breeding programs.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de l'UMR 1095 INRA-Université Blaise Pascal Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales. Je tiens à remercier Gilles Charnet pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Je tiens à remercier également l'Université d'Alep - Syrie qui m'a attribuée la bourse de la thèse dans le cadre de l'accord de la collaboration scientifique Franco-syrien (groupe 7), et je suis très reconnaissant à M. Kinan Darkazanli qui a encadré mes études supérieures du côté syrien.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

M. Said Mouzeyar, de l'UBP, qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

M. Pierre Devaux de Florimond Desprez et M. Alain Ghesquiere de l'IRD qui ont bien voulu être les rapporteurs de ce manuscrit.

Mme. Nabila Yahiaoui du CIRAD en tant qu'examineur de mon mémoire de thèse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Catherine Feuillet, ma directrice de thèse, qui m'a accueilli dans son équipe et m'a proposé un sujet riche et passionnant. Je la remercie très sincèrement pour l'encadrement scientifique apporté au cours de ces années de thèse. Elle a toujours été disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions, et s'est toujours intéressée à l'avancée de mes travaux. Grâce à ses grandes qualités humaines elle m'a aidé à passer tous les caps difficiles en m'encourageant lorsque j'en avais besoin. Encore merci pour l'aide apportée à la rédaction en français de ce rapport.

Je voudrais remercier tout particulièrement Michel Bernard, mon co-directeur de thèse, pour son suivi et sa disponibilité. Malgré son départ à la retraite, il est resté à l'écoute de mes nombreuses questions. Merci pour ses conseils, ses qualités humaines et pour le temps qu'il a consacré aux relectures et aux précieuses corrections.

Je voudrais exprimer mes profonds respects à Pierre Sourdille qui a répondu avec gentillesse à toutes mes questions durant ces années. Nos discussions scientifiques m'ont apporté une aide précieuse. Merci pour l'aide aux rédactions de l'article et de mon rapport. Encore merci pour avoir accepté d'examiner mon mémoire de thèse.

Je remercie Georges Gay et Alain Loussert pour leur aide précieuse lors des cultures en serre nécessaires au développement des populations. Le test du phénotypage a occasionné un grand nombre de castrations et pollinisations. Je dois beaucoup à Georges qui n'a pas hésité à m'apprendre la technique et enrichir mes connaissances par des discussions sur les croisements interspécifiques. Merci à Ludo, Stéphane et Marie Reine qui ont aussi participé au phénotypage 2009.

A grand merci à Jacqueline Philippon qui m'a aidé sans hésitation avec patience pour le génotypage, sur capillaire, mais surtout au départ sur gels d'acrylamide... ! Sans oublier son aide en serre et pour les extractions d'ADN.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Annaïg Bouguennec et François Balfourier qui m'ont fourni le matériel végétal ainsi que les données phénotypiques pour évaluer l'utilité des marqueurs. Encore merci pour le temps consacré lors de nos discussions sur l'aptitude au croisement et sur la biodiversité.

Je dois un grand merci à nos bio-informaticiens, Philippe Leroy et Frédéric Choulet, qui n'ont pas hésité à m'aider pour l'analyse et l'annotation des séquences.

Merci à Etienne Paux qui m'a aidé au développement de marqueurs moléculaires surtout les ISBP et qui a toujours répondu gentiment à toutes mes interrogations.

Je dois remercier Sébastien Faure grâce à qui j'ai appris la construction de la banque shotgun.

Merci à Jérôme Salse pour sa disponibilité lors des discussions sur la synténie entre le blé et les espèces apparentées.

Merci à Delphine Boyer pour ses conseils techniques. Encore merci pour l'organisation sociale de la vie de l'équipe, la soirée annuelle de l'équipe est inoubliable !

Je ne peux pas oublier Bouzid qui s'est montré toujours disponible pour les conseils techniques. Encore merci pour la bonne ambiance surtout quand il dit : les thésards f..... ! ou quand il met un peu de glace dans le dos.

Merci à tous les thésards Camille, Cyrille, Umar, Vincent, Mathieu et Clément pour la bonne ambiance à l'unité, lors du déplacement pour participer aux JJC ou pour les bons moments passés lors des coupes de l'INRA (vice champions !).

Merci à Pierre Barret pour les discussions utiles sur la transformation et la future validation du gène SKr.

Je n'oublie pas de remercier toutes les membres de l'équipe qui montrent leur sympathie au quotidien, Nicolas, Charles, les deux Caroline, Anne, Véronique, Marie Claire et Isabelle.

Merci à Monique, Valérie, Patricia pour leur aide dans mes démarches administratives.

Merci à tous mes amis, surtout Mohammad Aldaaboul qui était plus qu'un ami, il était un frère. Merci pour ta présence à mes côtés aux moments difficiles.

Je garde mes remerciements amoureux pour ma femme Milad et mes filles Fatimah, Batoule et Khozama, qui m'ont soutenu au quotidien durant toutes ces années, je vous aime à l'infini... !

*Il m'est impossible de trouver les mots pour
remercier la personne que le Paradis a sous
ses pieds ... ma Mère...*

Abréviations

°C	: Degré Celsius
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
BAC	: Bacterial Artificial Chromosome
BC	: Backcross
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
cM	: Centimorgan
CNRGV	: Centre National de Ressources Génomiques Végétales
CS	: Chinese Spring
Ct	: Courtot
EST	: Expressed Sequence Tag
EST-SSR	: SSR dérivé d'EST
ET	: Ecart-type
FAO	: Food and Agriculture Organization
g, mg, µg, ng	: Gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
gSSR	: Genomic SSR
HD	: Haploïde Doubé
IC	: Intervalle de confiance
ISBP	: Insertion Site-Based Polymorphism
L, mL, µL	: litre, millilitre, microlitre
LB	: Luria-Bertani
LOD	: Logarithm of odd
M, mM, µM	: Molaire, millimolaire, micromolaire
Mha	: Million d'hectares
pb, kb	: Paire de bases, kilobase
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QTL	: Quantitative Trait Locus
Re	: Renan
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SSC	: Saline sodium citrate
SSD	: Single seed descent
SSR	: Simple Sequence Repeat
YAC	: Yeast Artificial Chromosome

Table des Matieres

1^{ère} Partie: Étude Bibliographique.....	23
I. Le blé tendre <i>Triticum aestivum</i> L.	25
1. Le blé en chiffres.....	25
2. La génétique du blé tendre	27
II. L'amélioration du blé tendre	31
1. La domestication du blé	31
2. La sélection du blé et son impact sur la variabilité génétique	33
2.1. Diminution de la variabilité génétique durant la domestication	33
2.2. Réduction de la variabilité génétique due à la sélection	35
3. Introduction de variabilité génétique chez le blé par hybridation interspécifique.....	39
3.1. L'introgression : Définition et importance.....	39
3.2. Exploitation de la variabilité interspécifique dans la tribu des Triticées	41
III. Déterminismes génétiques et physiologiques de l'aptitude au croisement.....	47
1. Définition	47
2. Systèmes contrôlant l'inaptitude au croisement chez les plantes	47
2.1. Contrôle de l'auto-incompatibilité intra-spécifique	49
2.2. L'aptitude au croisement entre sous espèces (exemple du riz).....	55
2.3. L'aptitude au croisement interspécifique (exemple du blé)	59
IV. Méthodologies de clonage de gènes.....	67
1. Stratégie « gène candidat ».....	67
1.1. Identification de gènes candidats par homologie	69
1.2. Identification de candidats par analyses d'expression différentielle	71
2. Clonage par mutagenèse insertionnelle	73
3. Le clonage positionnel	75
3.1. Principe	75
3.2. Les différentes étapes d'un clonage positionnel :	77
V. Utilisation de la colinéarité entre céréales pour accélérer la cartographie chez le blé	93
1. Définitions.....	93
1.1. Orthologie et Paralogie.....	93
1.2. Synténie et colinéarité	95
2. Génomique comparée chez les céréales	95
2.1. Analyses de macro-colinéarité	97
2.2. Analyses de micro-colinéarité	97
VI. Objectifs de la thèse	105
2^{ème} Partie: Analyses Phénotypiques et Génotypiques du Locus <i>SKr</i>	109
I. Matériel et Méthodes	111
1. Matériel végétal.....	111
1.1. Lignées parentales.....	111
1.2. Population <i>Ct x CS</i>	113
1.3. Population <i>MP98 x Ct</i>	113
1.4. Lignées aneuploïdes et lignées de délétions	115
2. Conditions de croissance des plantes :	115
3. Evaluation de l'aptitude au croisement du blé avec le seigle.....	115
3.1. Matériel.....	115
3.2. Méthode.....	117
3.3. Contrôles.....	117
3.4. Calcul du pourcentage d'aptitude au croisement.....	117
3.5. Définition des classes d'aptitude au croisement.....	119
4. Analyses moléculaires.....	119
4.1. Extraction d'ADN génomique	119
4.2. Analyses par marqueurs SSR.....	121
4.3. Analyses par marqueurs RFLP	123
5. Analyses statistiques et bioinformatiques	125
II. Résultats	127
1. Sélection de la population recombinante SSD	127
1.1. Caractérisation des marqueurs <i>gpw1072</i> et <i>dl103</i> utilisés pour la sélection des recombinants	127
1.2. Sélection des recombinants	129
2. Evaluation de l'aptitude au croisement avec le seigle	129
2.1. Evaluation des parents et définition des seuils pour les classes d'aptitude au croisement	129
2.2. Evaluation des SSDs.....	131

3. Cartographie génétique fine au locus <i>SKr</i>	133
3.1. <i>Exploitation des bases de données</i>	133
3.2. <i>Analyses statistiques et bioinformatiques</i>	133
III. Discussion	139
3^{ème} Partie : Cartographie Génétique Fine et Initiation de la Cartographie Physique de la Région de <i>SKr</i>	147
I. Matériels et Méthodes	149
1. Exploitation des marqueurs ADNc	149
1.1. <i>ESTs de blé (<i>Triticum aestivum</i> L.)</i>	149
1.2. <i>EST d'orge (<i>Hordeum vulgare</i> L.)</i>	149
2. Alignement des séquences	151
3. Marqueurs SSR et ISBP	151
4. Criblage de la banque BAC de Chinese Spring	151
4.1. <i>Criblage par PCR</i>	151
4.2. <i>Criblage par hybridation</i>	153
5. Construction et séquençage d'une banque shotgun à partir d'un clone BAC	155
5.1. <i>Extraction d'ADN des clones BAC</i>	155
5.2. <i>Construction de la banque</i>	155
5.3. <i>Séquençage partiel des clones BAC et assemblage</i>	157
II. Résultats	159
1. Exploitation des relations synténiques avec l'orge et le riz	159
1.1. <i>Des relations synténiques complexes entre la partie distale du chromosome 5BS et le riz</i>	159
1.2. <i>Cartographie des marqueurs EST d'orge</i>	159
2. Construction d'une carte physique au locus <i>SKr</i>	167
2.1. <i>Criblage de la banque CS par PCR</i>	167
2.2. <i>Criblage de la banque CS par hybridation</i>	169
3. Séquençage partiel des clones BAC et développement de nouveaux marqueurs	171
3.1. <i>Séquençage partiel du clone BAC 317L24</i>	171
3.2. <i>Séquençage partiel du clone BAC 2163O14</i>	171
4. Saturation de la région <i>SKr</i> avec de nouveaux marqueurs	173
4.1. <i>Marqueurs dérivés du clone BAC 317L24</i>	173
4.2. <i>Marqueurs dérivés du clone BAC 2163O14</i>	177
III. Discussion	179
4^{ème} Partie : Développement de Nouvelles Populations et Etablissement d'une Nouvelle Carte Génétique.....	189
I. Matériels et Méthodes	191
1. Développement de nouvelles populations : Saison 2004/2005	191
1.1. <i>MP6 x Ct</i>	191
1.2. <i>SSD226 x Ct</i>	191
1.3. <i>SSD280 x Ct</i>	193
2. Développement de nouvelles populations : Saison 2008/2009	193
2.1. <i>Populations issues de croisements entre SSD</i>	193
2.2. <i>Populations HIF (Heterogeneous inbred family)</i>	195
2.3. <i>Caractérisation des lignées avec les marqueurs des locus <i>Kr1</i> et <i>Kr2</i></i>	197
2.4. <i>Validation de l'aptitude au croisement avec le seigle</i>	199
2.5. <i>Cartographie génétique à partir de la population HIF SSD254.14 (2009)</i>	199
2.6. <i>Validation de l'ordre des marqueurs sur la population Re x CS</i>	201
II. Résultats	203
1. Analyse des populations créées en 2004/2005	203
1.1. <i>Analyse de la population F2 SSD226 x Ct</i>	203
1.2. <i>Disparition du polymorphisme dans la région de <i>SKr</i></i>	203
2. Développement de nouvelles populations à partir des individus de la SSD (2008/2009)	205
2.1. <i>Caractérisation de la composition allélique aux locus d'aptitude au croisement</i>	207
2.2. <i>Validation du phénotype des lignées hétérozygotes</i>	207
3. Phénotypage et génotypage de la population HIF SSD254.14	209
3.1. <i>Phénotypage</i>	209
3.2. <i>Cartographie génétique du locus <i>SKr</i> dans la population HIF SSD254.14</i>	211
3.3. <i>Relations entre la carte génétique HIF SSD254.14 et la carte physique au locus <i>SKr</i></i>	213
III. Discussion	215

5^{ème} Partie : Evaluation des Marqueurs cfb306 et cfb341 Pour la Sélection de <i>SKr</i>.....	225
I. Matériels et méthodes	227
1. Matériel végétal.....	227
1.1. <i>Lignées parentales</i>	227
1.2. <i>Evaluation des descendances</i>	227
2. Marqueurs utilisés	229
3. Evaluation du polymorphisme sur une collection de blés	229
II. Résultats	231
III. Discussion	235
6^{ème} Partie : Conclusions et Perspectives.....	239
I. Conclusions.....	241
II. Perspectives.....	247
Références	257
Annexes.....	295
Publication (Alfares et al, Genetics 2009)	315

Liste des Figures

Figure 1 : Production mondiale de blé entre les années 1980 et 2007.	24
Figure 2 : Représentation schématique des 3 génomes A, B et D composant le génome du blé tendre <i>Triticum aestivum</i> .	26
Figure 3 : Représentation schématique de l'histoire évolutionnaire des espèces de <i>Triticum</i> et <i>Aegilops</i> .	28
Figure 4 : Représentation schématique montrant le devenir du chromosome B du groupe 5 de blé hexaploïde dans des lignées euploïdies et aneuploïdes.	30
Figure 5 : La région du Croissant Fertile étant à l'origine de la domestication du blé engrain.	32
Figure 6 : Arbre phylogénétique construit par HAUDRY <i>et al.</i> (2007).	34
Figure 7 : Arbre de Fitch-Margoliash pour 11 accessions d' <i>Ae. tauschii</i> , 119 de blés de pays et 123 variétés modernes de blé.	36
Figure 8 : Contrôle génétique du système gamétophytique (GSI).	48
Figure 9 : Modèle du mécanisme cellulaire impliqué dans le system GSI chez le coquelicot (<i>Papaver rhoeas</i>).	50
Figure 10 : Modèle moléculaire de la réponse à l'auto-incompatibilité (SI) chez les <i>Brassicaceae</i> .	52
Figure 11 : Contrôle génétique de l'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI) par deux locus multi-allélique S et Z.	54
Figure 12 : Représentation schématique du parcours du tube pollinique.	60
Figure 13 : Cartographie génétique des principaux gènes affectant l'aptitude au croisement entre le blé et le seigle.	62
Figure 14 : Représentation schématique des différentes étapes d'un projet de clonage positionnel.	74
Figure 15 : Relations taxonomiques dans la famille des Poacées.	94
Figure 16 : Diagrammes des cercles concentriques des génomes des céréales.	96
Figure 17 : Schéma de production de la lignée MP98 et de la population MP98 x Ct.	112
Figure 18 : représentation schématique des délétions sur le chromosome 5B de blé hexaploïde (<i>Triticum aestivum</i>).	114
Figure 19 : A : Photo prise en serre pour les individus testés en 2005.	116
Figure 20 : Résultats de croisements du blé avec le seigle et d'autofécondation du blé.	118
Figure 21 : Carte schématique des locus de compatibilité caractérisés par analyse QTL sur la population MP98 x Ct.	126
Figure 22 : Caractérisation du polymorphisme des marqueurs gpw1072 et dl103.	126
Figure 23 : Aptitude des parents Ct, MP98 et CS au croisement avec le seigle.	128
Figure 24 : Evaluation de l'aptitude au croisement pour 50 SSD sélectionnés entre les deux marqueurs gpw1072 et dl103.	130
Figure 25 : Carte génétique initiale construite pour 69 SSD et pour 50 SSD.	134
Figure 26 : Cartes génétiques et relations synténiques entre les parties distales des chromosomes 5BS et 5HS.	161
Figure 27 : Assignation du marqueur ATPase1-5B.	162
Figure 28 : Cartographie génétique des locus <i>SKr</i> et <i>GSP</i> sur la partie distale du bras chromosomique 5BS et micro-colinéarité avec le chromosome 12L de riz.	164
Figure 29 : Assignation des marqueurs SSR cfb306 et cfb309 au chromosome 5B et au bin de délétion distale.	166
Figure 30 : Représentation schématique des clones BAC identifiés lors du criblage de la banque BAC de Chinese Spring par PCR et par hybridation.	166
Figure 31 : Assignation du marqueur cfb341 au chromosome 5B et aux bins de délétion sur 5BS.	168
Figure 32 : Carte génétique et physique au locus <i>SKr</i> et relations synténiques avec le riz.	170
Figure 33 : Carte génétique de la partie distale du chromosome 5BS de la population MP98 x Ct après densification par de nouveaux marqueurs.	174
Figure 34 : Alignement entre la séquence du contig Ctg09 issu du clone BAC 317L24 et les deux locus cfb331-5D et cfb331-5B.	174
Figure 35 : Schéma de production de nouvelles populations (2004/2005) et (2008/2009).	190
Figure 36 : Obtention de 1850 plantes F2 de la population SSD226 x Ct (2007) en format de plaque 96.	202
Figure 37 : Composition allélique aux marqueurs cartographiés sur la partie distale de 5BS.	202
Figure 38 : Aptitude au croisement de 223 individus issus de la population d'autofécondation SSD254.14.	209
Figure 39 : Cartographie génétique sur la population HIF SSD254.14 et validation des distances génétiques et de l'ordre des marqueurs.	212
Figure 40 : Quatre individus recombinants entre les marqueurs les plus proches de <i>SKr</i> .	212
Figure 41 : Relations entre la carte génétique HIF SSD254.14 et la carte physique du locus <i>SKr</i> .	214
Figure 42 : Schéma d'introduction de l'aptitude au croisement par la méthode de backcross sans utilisation des marqueurs moléculaires.	226
Figure 43 : Représentation graphique du phénotype et du génotype des parents et des descendances de différents croisements avec la lignée de substitution Ct(5B FK).	230
Figure 44 : Schéma d'introduction de l'aptitude au croisement par la méthode de backcross à l'aide des marqueurs moléculaires.	234

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Espèces de la famille des Poacées croisées avec le blé hexaploïde.	38
Tableau 2 : Sous-familles de graminée et tribus dans les quelles l'auto-incompatibilité (SI) a été identifié.	54
Tableau 3 : Probabilité d'obtenir l'intervalle cible <100 kb pour diverses tailles d'échantillon.	88
Tableau 4 : Test χ^2 pour une ségrégation 1 : 1, sur 50 SSD et sur 69 SDD.	130
Tableau 5 : Marqueurs SSR testés pour leur polymorphisme entre MP98 et Ct.	132
Tableau 6 : Marqueurs RFLP testés pour leur polymorphisme entre MP98 et Ct.	132
Tableau 7 : Marqueurs testés sur les chromosomes 5BL (<i>Kr1</i>) et 5AL (<i>Kr2</i>).	136
Tableau 8 : Analyse de corrélation entre 3 marqueurs sur le chromosome 5BL (<i>Kr1</i>), 4 marqueurs sur le 5AL (<i>Kr2</i>), gwm234 sur 5BS (<i>SKr</i>) et le phénotype (l'aptitude au croisement).	137
Tableau 9 : Marqueurs d'orge génétiquement cartographiés sur la partie distale du bras chromosomique 5HS.	148
Tableau 10 : Relation de colinéarité entre 50 ESTs physiquement assignées sur le bin de délétion 5BS6 et le riz.	158
Tableau 11 : Relations synténiques entre orge, blé et riz pour 21 marqueurs d'orge.	160
Tableau 12 : 44 clones BAC identifiés par criblage de la banque de clones BAC de Chinese Spring par hybridation.	168
Tableau 13 : Analyse comparée des séquences génomiques partielles obtenues à partir des clones BAC 317L24 (Ctg : 19, 20 et 09) et 2163O14 (Ctg : 46 et 101) et de la séquence du génome de riz.	172
Tableau 14 : Alignement entre les contigs des séquences partielles (shotgun) du clone BAC 2163O14 partagées avec la séquence du clone BAC 1793L02 (CT009585) de la variété Renan.	172
Tableau 15 : Bilan de croisement F ₇ SSD355 x F ₇ SSD566.	204
Tableau 16 : Bilan de croisement F ₇ SSD524 x F ₇ SSD566.	204
Tableau 17 : Quatre individus F ₆ ont été sélectionnés pour chacune des lignées SSD (254, 373, 508 et 511) hétérozygotes au locus distaux dans la région de <i>SKr</i> sur le chromosome 5BS.	204
Tableau 18 : Estimation du nombre de grains obtenu par plante et par lignée suite à l'autofécondation des plantes F ₆ servant à créer des nouvelles populations HIF.	204
Tableau 19 : Composition allélique aux locus d'aptitude au croisement <i>SKr</i> (5BS), <i>Kr1</i> (5BL) et <i>Kr2</i> (5AL).	206
Tableau 20 : Bilan du test d'aptitude au croisement avec le seigle sur les SSDs hétérozygotes (254, 373, 508 et 511) servant à la création des nouvelles populations d'autofécondation.	208
Tableau 21 : Test χ^2 pour une ségrégation 1:3 et 1:2:1 pour des marqueurs cartographiés au locus <i>SKr</i> sur le 5BS dans les populations SSD254.14 et F ₂ Re x CS.	208
Tableau 22 : 11 lignées croisables issues de croisements entre des blés français non croisables et la lignée de substitution croisable Ct(5B FK).	229
Tableau 23 : Caractérisation du type d'allèle aux locus cfb306 et cfb341 sur une collection de 66 blés provenant de plusieurs pays.	232

Liste des Annexes

Annexe 1 : Phénotypage et génotypage avec les marqueurs dl103 et gpw1072 des 69 SSD sélectionnés dans la population MP98 x Ct.	297
Annexe 2 : 13 marqueurs SSR et 17 marqueurs ISBP désignés pendant nos travaux de thèse sur la séquence du clone BAC 1793L02 (Re).	301
Annexe 3 : 26 marqueurs SSR (nom initié par cfb) et 10 marqueurs ISBP (nom initié par cfp) désignés sur la séquence du clone BAC 317L24 (CS).	303
Annexe 4 : SSRs (cfb) et ISBS (cfp) désalignés de la séquence shotgun du clone BAC 2163O14 (CS).	305
Annexe 5 : Test d'aptitude de 223 individus de la population d'autofécondation SSD254.14 avec le seigle (<i>Secale cereale</i> var. Dankowskie Nowe).	307

1^{ère} Partie: Étude Bibliographique

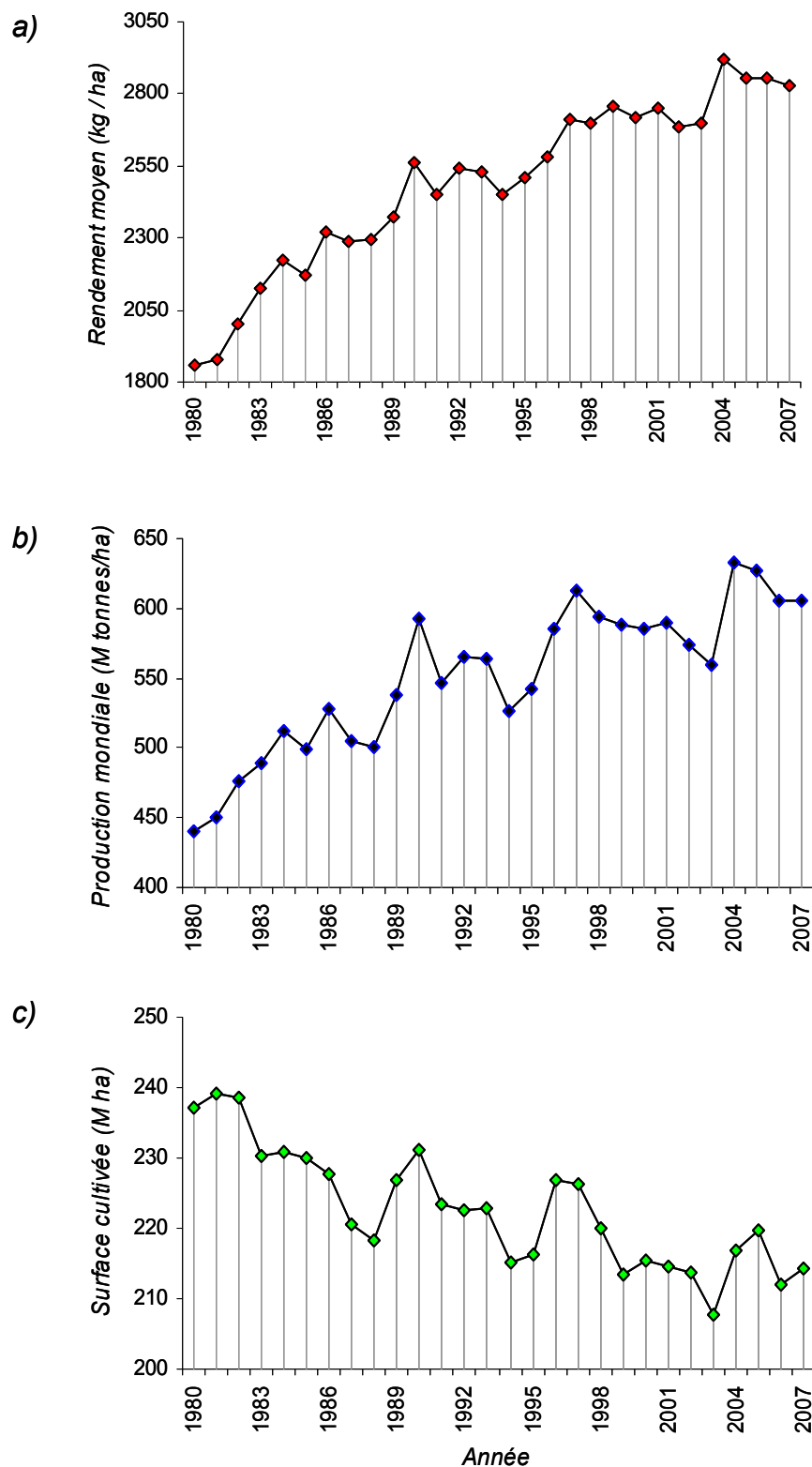


Figure 1: Production mondiale de blé entre les années 1980 et 2007. (a) Production moyenne en kg/ha, (b) Production mondiale en millions de tonnes /année, (c) Surface mondiale cultivée en millions ha / année (source : www.fao.org).

I. Le blé tendre *Triticum aestivum* L.

1. Le blé en chiffres

Le blé (*Triticum ssp.*), le maïs (*Zea mays* L.) et le riz (*Oryza sativa* L.) représentent plus de 85% de l'ensemble de la production mondiale de céréales. Ils constituent la source principale de glucides pour l'alimentation humaine dans le monde et plus de la moitié des calories alimentaires consommées, le blé en fournissant à lui seul plus d'un quart (FAO, Juillet 2007 ; <http://faostat.fao.org/>). La majorité du blé cultivé (> 95%) correspond au blé tendre (*Triticum aestivum* L.) qui est employé pour la fabrication de pains, biscuits, pâtisseries et nouilles. Le blé dur (*Triticum durum* L.) est lui utilisé pour la fabrication de pâtes, de semoule et d'autres produits. Le blé engrain (*Triticum monococcum* L.) et d'autres blés à grain vêtu (Emmer et Spelt) utilisés historiquement sont devenus aujourd'hui des cultures d'importance plus mineure.

Le blé tendre est cultivé sur 214.2 millions d'ha, avec un rendement moyen de 2830 kg/ha, ce qui présente une production annuelle d'environ 600 millions de tonnes (Figure 1a,b année 2007, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>). Au milieu de l'année 2008, la population mondiale était estimée à 6.6 milliards d'habitants (<http://www.prb.org>) et la quantité de blé disponible était équivalente à 91 kg de grains par habitant. Au cours des trois dernières décennies, la production mondiale du blé a progressé (28 % d'augmentation entre 1980 et 2007, Figure 1a,b) tandis que la surface cultivée diminuait de ~10% pour la même période (Figure 1c).

Ainsi, l'augmentation réelle de la production à l'unité de surface peut être corrigée à 34,5%. Cependant, après une augmentation remarquable jusqu'en 2004, la production mondiale a diminué de 3,1% pendant ces quatre dernières années (Figure 1b) tandis que la population mondiale augmentait de 0.4% pendant la même période. Celle-ci devrait dépasser les 9 milliards d'individus en 2050 (<http://www.un.org>) et les signes de stagnation de la production (Figure 1b,c) inquiètent donc les spécialistes de la sécurité alimentaire mondiale. Ils font craindre des problèmes de famine dans les années à venir si des épisodes climatiques ou des attaques de pathogènes venaient à déstabiliser la production comme cela a été le cas ces dernières années avec des épisodes de sécheresse en Australie et aux États-Unis.

En réponse aux famines du Mexique et surtout de l'Inde, dans les années 1960 "la révolution verte" a permis d'obtenir un gain énorme dans la production des grandes cultures,

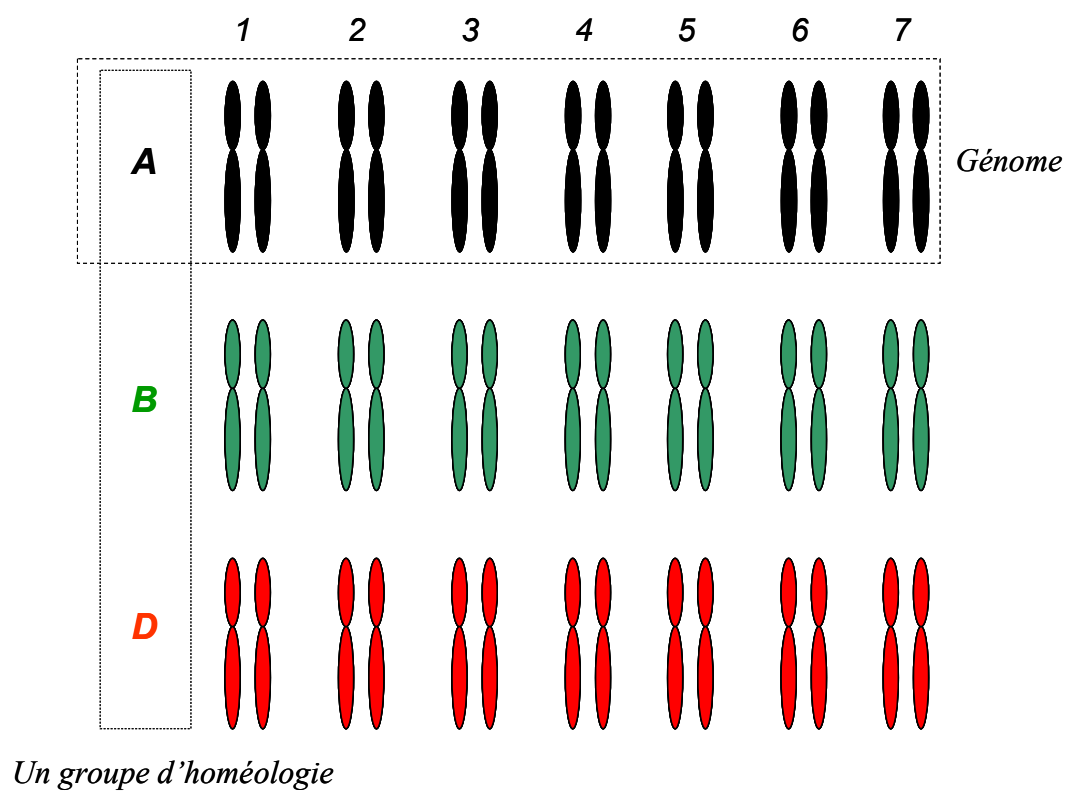


Figure 2 : Représentation schématique des 3 génomes A, B et D composant le génome du blé tendre (*Triticum aestivum* L.).

en particulier les céréales. Cette révolution basée sur le progrès génétique et la modification des pratiques culturales a permis entre 1966 et 2000 d'augmenter la production alimentaire de 125% dans les zones où la densité des populations a presque doublé (KHUSH 2001).

Aujourd'hui, l'augmentation croissante de la population mondiale exige une progression de 50% de la production alimentaire d'ici 2050 (KHUSH 2001). Cette augmentation devra être réalisée à partir de moins de surfaces cultivables, avec moins d'eau, moins de travail et moins de produits chimiques, dans des conditions climatiques plus contrastées et changeantes, et elle devra donc être réalisée avec de nouvelles stratégies. Les méthodes de sélection traditionnelles continueront à être utilisées, complétées par le génie génétique et les techniques de la génomique, qui offrent de nouvelles opportunités pour identifier les bases génétiques des caractéristiques désirées et pour faciliter le développement de nouvelles variétés. Plusieurs approches biotechnologiques sont à l'étude pour accroître le potentiel de rendement des grandes cultures. Il s'agit notamment de l'introduction de nouveaux gènes clonés, qui pourront être issus des collections de ressources génétiques, dans les variétés élites par transgénèse ou par l'utilisation de marqueurs moléculaires pour accélérer et améliorer l'efficacité de la sélection. En plus de l'augmentation du potentiel de rendement, il sera aussi nécessaire d'assurer une bonne stabilité de la production et donc de développer des variétés plus résistantes aux stress biotiques (maladies et insectes) et abiotiques (stress environnementaux) qui peuvent causer de fortes baisses de rendement.

2. La génétique du blé tendre

Les espèces du genre *Triticum* sont très variées dans leur composition chromosomique avec certaines espèces diploïdes qui possèdent deux jeux de chromosomes ($2n=2x=14$) et un grand nombre d'espèces polyploïdes stables contenant quatre (tétraploïde, $2n=4x=28$) ou six (hexaploïde, $2n=6x=42$) jeux de chromosomes (Figure 2).

Le génome du blé tendre (*T. aestivum* L.) est constitué de trois génomes A, B et D et résulte de l'hybridation successive de génomes diploïdes et tétraploïdes avec des génomes diploïdes (Figure 3). La première hybridation s'est faite il y a 0.5 à 1.3 million d'années entre *Triticum urartu* Thum. Ex. Gandil. (A^uA^u , $2n=14$) (DVORAK *et al.* 1993) et plante ou plusieurs plantes encore non identifiées originaires le plus probablement de la section Sitopsis (BB, $2n=14$) (BAHRMAN *et al.* 1988; KILIAN *et al.* 2007). Celle-ci a résulté en un blé tétraploïde *Triticum turgidum* L. ($2n=28$, AABB, Figure 3) qui a donné naissance à plusieurs groupes variétaux distincts dont *T. turgidum* var. *diccocoides*, non cultivable et considéré comme le plus proche du type primitif (Figure 3). Cette lignée a, à son tour, donné lieu à plusieurs

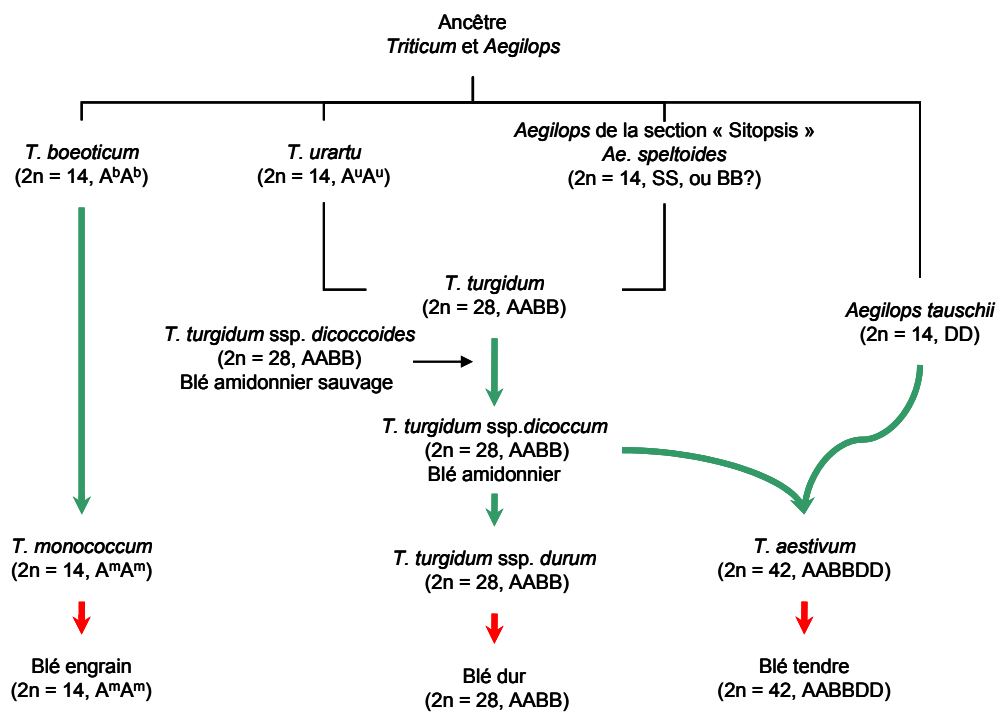


Figure 3 : Représentation schématique de l'histoire évolutive des espèces de *Triticum* et *Aegilops*. D'après FEUILLET *et al.* (2008).

groupes cultivés qui sont tous inter-fertiles. La variété *T. turgidum* var. *dicoccon* (AABB), dérivée de *T. turgidum* var. *diccoides*, est le probable progéniteur du blé hexaploïde (AABBDD) au travers d'une hybridation avec l'espèce sauvage *Aegilops tauschii* (DD) (KIMBER and FELDMAN 1987) il y a 8 à 10'000 ans. Des études ont indiqué l'existence d'au moins 2 progéniteurs génétiquement différents à l'origine du génome DD du blé hexaploïde, suggérant des événements indépendants de polyploïdisation (DVORAK *et al.* 1998; GILES and BROWN 2006).

Les chromosomes des génomes A, B et D présentent une similitude génétique malgré leurs origines différentes. SEARS (1954) a classé les 42 chromosomes du blé tendre en sept groupes, composés chacun de trois paires de chromosomes sur la base de leurs affinités. Les paires d'un même groupe sont dites homéologues (Figure 2). Normalement, l'appariement entre chromosomes homéologues ne se fait pas à la méiose, et seuls les chromosomes homologues s'apparient. Ce phénomène est contrôlé génétiquement par un ensemble de gènes localisés sur plusieurs chromosomes, dont le plus important est le gène *Ph1* situé sur le bras long du chromosome 5B (GILL *et al.* 1993; JAMPATES and DVORAK 1986; RILEY and CHAPMAN 1958 ; SEARS and OKAMOTO 1958). Ainsi malgré la complexité de son génome, l'analyse génétique du blé tendre ne revêt pas de difficulté particulière puisqu'il se comporte au moment de la méiose comme un génome diploïde.

Grâce à son statut polyploïde, le blé supporte en général assez bien les aberrations chromosomiques telles que l'absence d'un chromosome ou d'une fraction de chromosome. Cette propriété a été largement utilisée par Earnie Sears pour créer toute une série de lignées aneuploïdes (Figure 4) dont les premières furent des lignées monosomiques et ditélosomiques (SEARS 1954), suivies des lignées nulli-tétrasoniques (NT) (SEARS 1966) (Figure 4). Une lignée nullisomique-tétrasonique est une lignée dans laquelle une paire de chromosomes est manquante et est remplacée par une autre paire de chromosomes homéologues. Le génome d'une lignée NT chez un blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$) est donc composé de 19 paires + 4 chromosomes (correspondant à un chromosome présent en 4 exemplaires au lieu de deux pour compenser la paire de chromosomes homéologues manquants) (Figure 4). Elles sont très utiles en cartographie car elles permettent de rapidement identifier la localisation chromosomique d'un segment d'ADN (marqueur, gène). Ces différentes lignées ont également été très utiles pour la création de lignées de substitutions dans lesquelles un chromosome entier d'une variété est remplacé par celui d'une autre (Figure 4) permettant ainsi d'identifier la présence d'un allèle d'intérêt sur un chromosome particulier.

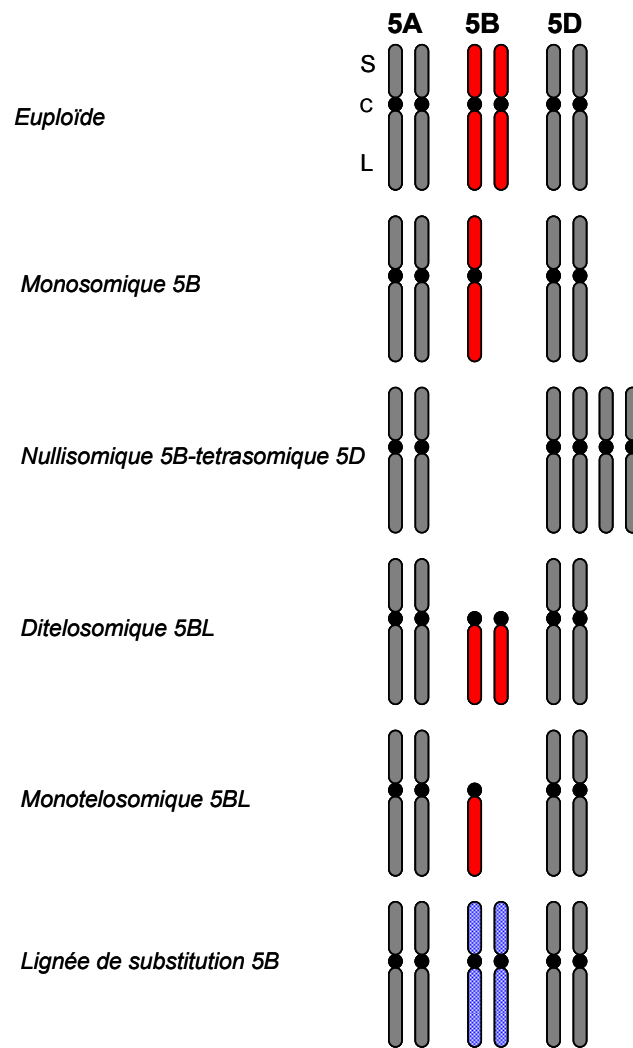


Figure 4 : Représentation schématique montrant le devenir du chromosome B du groupe 5 de blé hexaploïde dans des lignées euploïdes et aneuploïdes.

Dans les années 40, KIHARA (1944) montrent que des hybridations blé-*Aegilops* et backcross, certains chromosomes de lignées d'*Aegilops* sont préférentiellement ou exclusivement transmis dans la génération suivante. ENDO (1988) démontra par la suite que les gamètes qui ne contenaient pas les chromosomes d'*Aegilops* souffraient de cassures et de délétions terminales de longueurs variables. Ces lignées furent caractérisées et utilisées pour établir une série de lignées de délétions encore très utiles aujourd'hui pour localiser plus finement un segment d'ADN le long d'un bras de chromosome. Les 16 lignées de délétions du chromosome 3B ont ainsi été largement employées pour ancrer les contigs de BAC constituant la carte physique de ce chromosome (PAUX *et al.* 2008).

II. L'amélioration du blé tendre

1. La domestication du blé

Triticum boeoticum Boiss. (A^bA^b) est l'espèce sauvage la plus apparentée au blé engrain domestiqué (A^mA^m , *Triticum monococcum* L., Figure 3) qui a probablement été la première espèce de blé cultivée par les fermiers du néolithique il y a 10,000 ans environ, dans le Nord et l'Est du Croissant Fertile (HARLAN and ZOHARY 1966) (Figure 5). Plusieurs études archéologiques et moléculaires ont essayé de mettre en évidence l'origine et les premières étapes de la domestication pour cette espèce. TANNO and WILLCOX (2006) ont examiné des restes carbonisés de blés prélevés sur plusieurs sites archéologiques au Proche Orient (Sud-est de la Turquie et le Nord de la Syrie) pour savoir si ces blés étaient à rachis cassant (sauvages) ou rachis solide (domestiques). Ils ont démontré que dans les champs de l'époque, il y a 9250 ans, les récoltes étaient composées de blé sauvage mais également d'autres éléments domestiqués. Entre 9250 et 7500 ans avant JC, les types domestiqués augmentent progressivement mais sont lents à s'établir, les types sauvages restant encore compétitives. Cette lenteur implique que le blé sauvage a été cultivé longtemps sans évolution notable. D'un point de vue moléculaire, HEUN *et al.* (1997) ont mis en évidence le site de la domestication du blé engrain en se basant sur deux hypothèses: (1) la première est que la distance génétique entre les espèces peut être évaluée par l'étude d'empreintes génétiques en utilisant des marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (VOS *et al.* 1995), (2) la deuxième est que les progéniteurs des plantes cultivées n'ont pas subi des changements significatifs au niveau génétique au cours des 10'000 dernières années (ZOHARY and HOPF 1993). HEUN *et al.* (1997) ont analysé 338 lignées des blés engrain collectées pour leurs caractères agronomiques et taxonomiques dans différentes régions, des Balkans au croissant

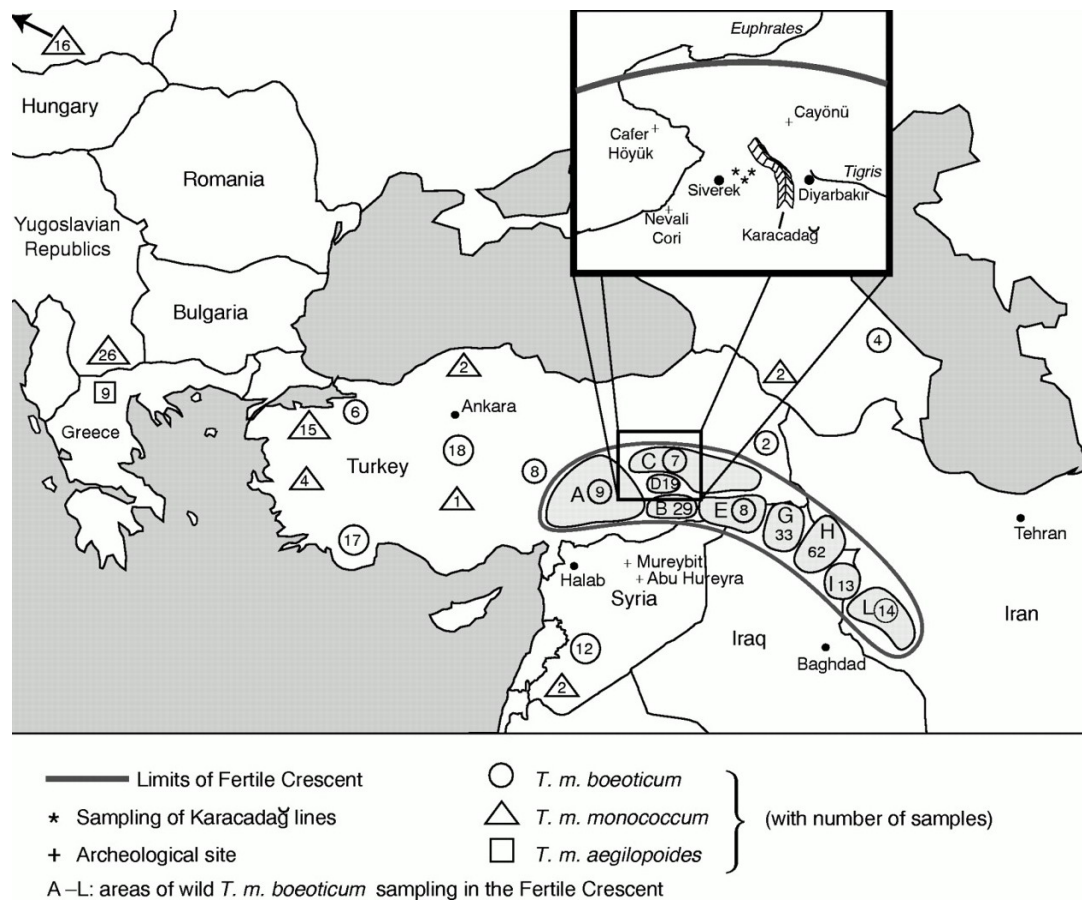


Figure 5 : La région du Croissant Fertile étant à l'origine de la domestication du blé engrain. Le cadre dans la photo représente la région de Karacadağ. D'après HEUN *et al.* (1997).

fertile, et ont comparé les empreintes génétiques à partir de 288 bandes AFLP. Les auteurs ont trouvé que le groupe des lignées collectionnées dans les sites extérieurs (montagnes volcaniques de Karacadag, Sud-est de la Turquie et Diyarbakir, Figure 5) sont remarquablement séparés des groupes provenant du Croissant fertile. L'intégration de lignées cultivées de *T. monococcum* (provenant des pays Méditerranéens, de l'Europe centrale, des Balkans et de la Turquie), et de lignées de *T. aegilopoides* dans l'analyse a ensuite permis aux auteurs de conclure que la région du Karacadag devait être le site de domestication du blé engrain *T. monococcum* (Figure 5).

La plupart des blés tétraploïdes, tels que le blé amidonnier et le blé dur sont issus du blé sauvage *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* (AABB, la forme primitive de *T. turgidum* var. *turgidum*) (Figure 3). Des analyses d'empreinte génétique par AFLP (OZKAN *et al.* 2005) ont montré que les lignées sauvages collectionnées au Sud-est de la Turquie et plus précisément dans la région de Karacadag étaient les plus apparentées au blé domestiqué (AABB), suggérant que le site de domestication du blé dur est proche de celui du blé diploïde. A l'inverse des blés diploïdes et tétraploïdes, le blé hexaploïde n'existait pas sous forme sauvage. Il a évolué dans les champs des premiers agriculteurs à l'époque du néolithique après une hybridation entre les blés tétraploïdes domestiqués *T. turgidum* var. *turgidum* et la graminée sauvage *Aegilops tauschii* Coss., à l'origine du génome DD (KIHARA 1944; MCFADDEN and SEARS 1946) (Figure 3).

2. La sélection du blé et son impact sur la variabilité génétique

2.1. Diminution de la variabilité génétique durant la domestication

La sélection intensive des caractères agronomiques par l'homme a très certainement réduit la diversité génétique de la plupart des plantes cultivées (TANKSLEY and MCCOUCH 1997). La comparaison de la perte de diversité entre les génomes des espèces sauvages et cultivées pour un ensemble large de gènes peut être utilisée pour établir des scénarios du goulot d'étranglement pendant la domestication. L'hypothèse de base est que les gènes non sélectionnés ont des niveaux de diversité nucléotidique homogène à l'échelle du génome, alors que les gènes sélectionnés au cours ou après la domestication montrent une diminution locale plus sévère de la diversité nucléotidique.

HAUDRY *et al.* (2007) ont caractérisé la diversité génétique du blé domestiqué (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*), des blés actuellement cultivés (*T. turgidum* ssp. *durum* et *T. aestivum*

ssp. aestivum) et de leur parent tétraploïde sauvage (*T. turgidum ssp. dicoccoides*) en étudiant la diversité nucléotidique de 21 gènes dans une collection de 101 individus provenant de 4 taxa. Leurs résultats (Figure 6) montrent que la transition de la forme sauvage aux formes cultivées a été marquée par une diminution importante de la diversité nucléotidique, avec des formes tétraploïdes domestiquées *dicoccum* et *durum* respectivement 70% et 84% moins diverses que la forme sauvage *dicoccoides*, et la forme hexaploïde cultivée *aestivum* 69% moins diverse que *dicoccoides*. La distribution des séquences de la forme *dicoccum* dans l'ensemble de l'arbre phylogénétique (Figure 6) couvrant toute la gamme de la diversité chez *aestivum*, a conduit les auteurs à proposer que des flux de gènes ont eu lieu entre les populations dans le voisinage de *dicoccum*, ce qui est en accord avec les suggestions de DVORAK *et al.* (2006).

Après la domestication, les sous-espèces du blé dur et tendre ont été soumises à des événements sélectifs additionnels pendant l'évolution des « populations de pays » (landrace) puis par l'application d'une sélection systématique. KAMMORGAN *et al.* (1989) ont ainsi montré que les taux de polymorphisme entre diverses accessions d'*Ae. tauschii* sont plus importants que ceux des variétés de blé hexaploïdes. LIU *et al.* (1990) ont également observé plus de polymorphisme (39%) chez des accessions de *T. aestivum var. spelta* (la forme la plus primitive de l'espèce *T. aestivum*) que chez *T. aestivum var. aestivum*. Finalement, les résultats de HAUDRY *et al.* (2007) indiquent que chez le blé dur, 84% de la diversité nucléotidique présente dans la forme sauvage *dicoccoides* a disparu.

2.2. Réduction de la variabilité génétique due à la sélection

La diversité génétique (enrichie, fixée ou diminuée) a été également influencée, positivement ou négativement, par les pratiques adoptées dans les différents programmes de sélection au cours du XX^{ème} siècle.

Certaines études suggèrent que la réduction de la diversité génétique accompagnant l'amélioration des plantes a été finalement assez limitée. Ainsi, des analyses phénotypiques et génotypiques effectuées par DONINI *et al.* (2000) sur 55 variétés de blé d'hiver inscrites au catalogue du Royaume Uni entre 1934 et 1994 semblent indiquer que les niveaux de diversité présents dans le blé d'hiver du Royaume-Uni ont été maintenus inchangés depuis les années 30. Il semble également que les changements de diversité soient plutôt d'ordres qualitatifs que quantitatifs, *i.e.* correspondent plus à des modifications du type de diversité que les sélectionneurs ont visé à introduire dans leurs programmes (au travers de la sélection

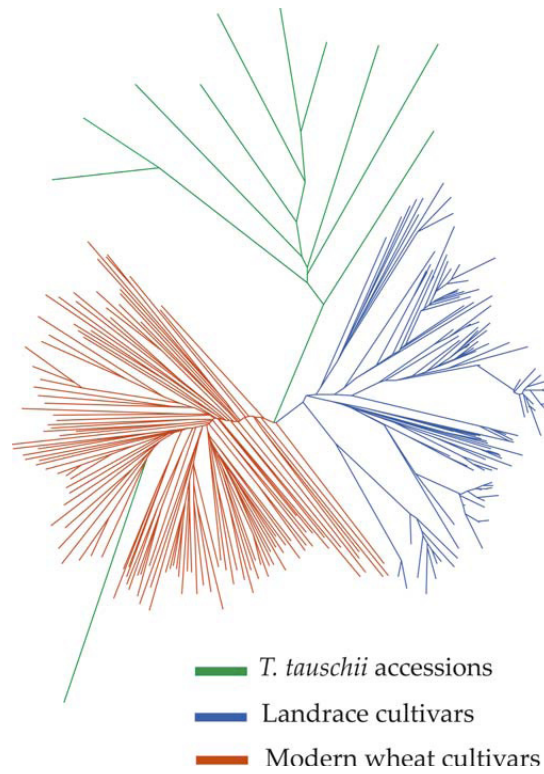


Figure 7 : Arbre de Fitch-Margoliash pour 11 accessions d'*Ae. tauschii*, 119 de blés de pays (LC) et 123 variétés modernes de blé (MWC). D'après REIF *et al.* (2005).

de caractères particuliers tels que le nanisme ou la photopériode) qu'à une modification du niveau de la diversité globale dans les variétés. La nécessité d'introduire de nouveaux gènes/allèles de résistance aux maladies aurait également été un moteur important pour le renouvellement de la diversité. Les sélectionneurs ont clairement maintenu des sources diverses de matériel génétique dans leurs pépinières et leurs collections à cet effet, puis ils ont employé ces différentes sources dans les programmes d'amélioration et, par conséquence, des sous-ensembles de la diversité ont été libérés sous forme de variétés commerciales.

ROUSSEL *et al.* (2004) ont testé 41 marqueurs SSR représentant 42 locus polymorphes et couvrant tous les chromosomes du génome du blé hexaploïde sur une collection de 559 accessions de blés français (variétés enregistrées et blés de pays) cultivés entre 1800 et 2000. Les résultats montrent une réduction de la diversité allélique de 25% entre les « blés de pays » et les variétés élités. Les auteurs ont également observé quelques différences significatives dans la diversité entre différents programmes de sélection menés par différentes compagnies. ROUSSEL *et al.* (2005) ont ensuite étendu l'étude à 480 variétés européennes de 1840 à 2000, collectionnées dans 15 régions géographiques différentes. Ils ont montré que la diversité allélique est restée stable jusqu'aux années 1960 et une séparation claire entre les variétés créées avant et après 1970. D'autres différences ont été observées entre les variétés selon leur origines géographiques ce qui confirme de nouveau que la diversité est influencée par les pratiques de sélection et la politique agricole des différents pays.

Une étude menée par REIF *et al.* (2005) sur 253 variétés modernes de blé, de blés de pays et d'accessions d'*Ae. tauschii* collectionnées au CIMMYT, a également montré que la perte en diversité génétique diminue de plus en plus d'*Ae. tauschii* aux blés de pays, et des blés de pays aux variétés élités (Figure 7). Les auteurs ont conclu que la diversité génétique du blé a été réduite entre les années 1950 à 1989, mais a été de nouveau améliorée de 1990 à 1997.

Finalement, FU *et al.* (2005) ont étudié les changements de diversité génétique sur une collection de 75 variétés de blés canadiens sélectionnés entre les années 1845 et 2004 avec 31 marqueurs SSR (267 allèles). Cinquante allèles détectés dans les variétés obtenues avant 1910 n'ont pas été détectés dans les variétés créées après 1990. Plus récemment, FU and SOMERS (2009) ont re-testé ces 75 variétés du blé en augmentant le nombre des marqueurs SSR à 370 couvrant les 21 chromosomes de blé tendre. Ils ont observé une réduction allélique sur toutes les parties du génome. Cette réduction a commencé dans les années 1930 et la majorité de la réduction a été observée sur les 20 variétés les plus récemment créées, avec une perte nette de

Tableau 1 : Espèces de la famille des Poacées croisées avec le blé hexaploïde.

Espèces	2n	Auteurs
<i>Aegilops biuncialis</i>	48	(KNOBLOCH 1968)
<i>Aegilops caudata</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Aegilops columnaris</i>	28	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops comosa</i>	14	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops crassa</i>	28	(JOVKOVA <i>et al.</i> 1977)
<i>Aegilops cylindrica</i>	28	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops dichasians</i> = <i>Triticum dichasians</i> ?	14	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops juvenalis</i>	42	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops kotschy</i>	28	(KNOBLOCH 1968)
<i>Aegilops longissima</i>	14	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops mutica</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Aegilops ovata</i>	28	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops speltoides</i>	14	(CHUECA <i>et al.</i> 1977)
<i>Aegilops squarrosa</i>	14	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops triaristata</i>	42	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops tripsacoides</i>	-	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops triuncialis</i>	28	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops umbellulata</i>	14	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Aegilops variabilis</i>	28	(KNOBLOCH 1968)
<i>Aegilops ventricosa</i>	28	(KIMBER and ABUBAKAR 1979)
<i>Agropyron ciliare</i>	28	(SHARMA and GILL 1981a)
<i>Agropyron cristatum</i>	28	(CHEN <i>et al.</i> 1989)
<i>Agropyron cristatum</i> (L.)	14	(LIMIN and FOWLER 1990)
<i>Agropyron desertorum</i>	28	(LIMIN and FOWLER 1990)
<i>Agropyron desertorum</i> (Fisch. ex Link) Schult.	28	(CHEN <i>et al.</i> 1990; LIMIN and FOWLER 1990)
<i>Agropyron distichum</i>	28	(PIENAAR 1981)
<i>Agropyron elongatum</i>	14	(FRANKE <i>et al.</i> 1992)
<i>Agropyron intermedium</i>	42	(SHARMA and GILL 1983b)
<i>Agropyron michnoi</i> Roshev.	28	(CHEN <i>et al.</i> 1990; LI and DONG 1991)
<i>Agropyron podperae</i>	-	(DEWEY 1981)
<i>Agropyron scirpeum</i>	-	(SHARMA and GILL 1981b)
<i>Agropyron trachycaulum</i>	28	(SHARMA and GILL 1981b)
<i>Elymus altissimus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus anthosachnoides</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus canadensis</i>	28	(MUJEEBKAZI and BERNARD 1982; MUJEEBKAZI and BERNARD 1985; YEN and LIU 1987)

<i>Elymus caninus</i>	28	(CLAESSON <i>et al.</i> 1990; SHARMA and BAENZIGER 1986)
<i>Elymus caucasicus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus dahuricus</i>	42	(MUJEEBKAZI and BERNARD 1982; YEN and LIU 1987)
<i>Elymus dolichaterus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus fibrosus</i>	28	(MUJEEBKAZI and BERNARD 1982)
<i>Elymus giganteus</i>	28	(MUJEEBKAZI and RODRIGUEZ 1981)
<i>Elymus parviglumis</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus pendulinus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus pseudonutans</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus rectisetus</i>	42	(LIU <i>et al.</i> 1994)
<i>Elymus scabrus</i>	42	(AHMAD and COMEAU 1991)
<i>Elymus semicostatus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus shandongensis</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1989)
<i>Elymus tibeticus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus tibeticus</i>	28	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elymus tshinganicus</i>	42	(LU and VONBOTHMER 1991)
<i>Elytrigia acatium</i>	42	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Elytrigia campestre</i>	56	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Elytrigia pungens</i>	56	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Elytrigia repens</i>	42	(COMEAU <i>et al.</i> 1985; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Elytrigia varnese</i>	42	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Haynaldia villosa</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Hordeum bulbosum</i>	28	(FALK and KASHA 1981)
<i>Hordeum bulbosum</i>	14	(FALK and KASHA 1981)
<i>Hordeum californicum</i>	14	(GUPTA and FEDAK 1985)
<i>Hordeum chilense</i>	14	(MARTIN and CHAPMAN 1977)
<i>Hordeum clifornicum</i>	14	(GUPTA and FEDAK 1985)
<i>Hordeum depressum</i>	28	(JIANG and LIU 1987)
<i>Hordeum geniculatum</i>	28	(PERSHINA <i>et al.</i> 1988)
<i>Hordeum jubatum</i>	28	(COMEAU <i>et al.</i> 1988)
<i>Hordeum marinum</i>	14	(JIANG and LIU 1987)
<i>Hordeum pusillum</i>	14	(FINCH and BENNETT 1980)
<i>Hordeum spontaneum</i>	14	(BATES <i>et al.</i> 1976)
<i>Hordeum vulgare</i>	14	(KRUSE 1976)

<i>Leymus angustus</i>	56	(PLOURDE <i>et al.</i> 1992)
<i>Leymus angustus</i>	84	(COMEAU <i>et al.</i> 1985)
<i>Leymus cinereus</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Leymus innovatus</i>	28	(PLOURDE <i>et al.</i> 1989a)
<i>Leymus multicaulis</i>	28	(PLOURDE <i>et al.</i> 1989b)
<i>Leymus triticoides</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Psathyrostachys juncea</i>	14	(PLOURDE <i>et al.</i> 1990)
<i>Pseudoroegneria geniculata</i> subsp. <i>scythica</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Pseudoroegneria stipifolia</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Pseudoroegneria strigosa</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Secale africanum</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Secale ancestrale</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Secale cereale</i>	14	(BACKHOUSE 1916; KNOBLOCH 1968)
<i>Secale montanum</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Secale vavilovii</i>	14	(KNOBLOCH 1968)
<i>Thinopyron curvifolium</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Thinopyron gentryi</i>	42	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Thinopyron junceiforme</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Thinopyron junceum</i>	42	(CHARPENTIER <i>et al.</i> 1986; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Thinopyron sartorii</i>	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1984; MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)
<i>Thinopyrum bessarabicum</i>	14	(SHARMA and GILL 1983a)
<i>Thinopyrum ponticum</i>	70	(SMITH 1942)
<i>Thinopyrum pulcherrimum</i>	42	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1989)
<i>Thinopyrum rechingeri</i> (<i>Th. sartori</i>)	28	(MUJEEBKAZI <i>et al.</i> 1987)

17% ce qui confirme que les techniques adoptées dans les programmes de sélection réduisent de manière considérable la diversité allélique. Ces observations indiquent la nécessité d'une stratégie de conservation du germplasma de blé et de la réintroduction de diversité génétique dans les programmes de sélection.

3. Introduction de variabilité génétique chez le blé par hybridation interspécifique.

Pour répondre à la diminution de variabilité génétique observée dans les variétés de blé élite et introduire de nouveaux allèles favorables, un certain nombre d'outils et de méthodes ont été développés afin d'exploiter la variabilité présente chez les espèces apparentées. Celle-ci s'est faite notamment au travers d'hybridations interspécifiques ou inter-génériques et de la sélection d'introgessions intéressantes dans les descendances. Jusqu'à présent plusieurs espèces de la famille des graminées ont été croisées avec succès avec le blé hexaploïde (Tableau 1).

3.1. L'introgession : Définition et importance

Une introgression se définit comme le transfert de germplasma d'une espèce à une autre par des rétrocroisements répétés entre l'hybride résultant et l'une des espèces parentales (ANDERSON and HUBRICHT 1938; RIESEBERG and WENDEL 1993). Avec chaque rétrocroisement, les plantes résultant de l'hybridation accumulent progressivement les caractères du parent utilisé dans le rétrocroisement. La formation d'hybrides fertiles après le premier croisement puis d'individus fertiles lors des rétrocroisements est nécessaire pour réussir l'introgession entre deux espèces. La proximité phylogénétique, le niveau de ploïdie et la direction du croisement, jouent un rôle crucial pendant le processus d'introgession (RIESEBERG and WENDEL 1993).

Les introgressions ont joué un rôle important dans la structuration de la diversité génétique des espèces (RIESEBERG 1991; WENDEL *et al.* 1989), dans l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (RIESEBERG 1991), dans le transfert d'adaptation entre espèces (HEISER 1973; RIESEBERG *et al.* 2003), dans la formation de nouveaux écotypes (ABBOTT 1992; LEVIN 1967; RIESEBERG and WENDEL 1997) ou d'espèces (ARNOLD *et al.* 1991; SOLTIS and SOLTIS 1999) et dans l'évolution des espèces invasives (ANTTILA *et al.* 1998; ELLSTRAND and SCHIERENBECK 2000). Les espèces de la tribu des *Triticeae* (blé, orge, seigle...) sont considérées comme des donneuses potentielles de caractères agronomiques d'intérêt tels que la résistance aux stress biotiques et abiotiques et l'amélioration de la qualité

dans les programmes d'amélioration du blé tendre. Cela sousentend dans un premier temps que des croisements interspécifiques voire inter-génériques puissent être réalisés entre ces espèces et le blé tendre.

3.2. Exploitation de la variabilité interspécifique dans la tribu des Triticées

La tribu des Triticées (*Triticeae*) de la famille des Poacées (*Poaceae*) (anciennement *Gramineae*) représente un intérêt d'un point de vue agronomique puisqu'elle contient des céréales à paille : blé (*Triticum*), orge (*Hordeum*), seigle (*Secale*), Triticale (*Triticosecale*), et de nombreuses espèces appartenant aux genres *Aegilops*, *Agropyron*, *Elymus*, *Leymus*, *Thinopyrum*, *Roegneria*.

Les espèces de la tribu des Triticées proviennent d'une large gamme de distribution géographique et climatique, ce qui leur permet de s'adapter à des conditions très diverses, des régions les plus froides et humides aux régions les plus chaudes et arides. Ainsi, les espèces de Triticées cultivées ou sauvages représentent un potentiel de transfert de gènes d'intérêt pour améliorer la résistance aux stress biotiques (insectes, pathogènes) et abiotiques (tolérance au froid, tolérance à la salinité, résistance à la sécheresse...). Afin de rendre compte de la possibilité de croiser plus ou moins facilement une espèce avec une autre, trois types de pools génétiques (gene pools) : primaire, secondaire et tertiaire, ont été définis au sein des espèces :

3.2.1. Groupe génétique primaire

Le groupe génétique primaire du blé tendre (*T. aestivum*, $2n=6x=42$, AABBDD) comprend des populations de pays, le blé tétraploïde cultivé (*T. turgidum* $2n=4x=28$, AABB) et ses formes sauvages dérivées de *T. dicoccoides*, les espèces proches du donneur du génome AA, *T. monococcum* (incluant *var. boeoticum* et *var. urartu*), et du donneur du génome DD, *Aegilops tauschii*. Les gènes de ce groupe peuvent être transférés au génome du blé tendre par hybridation directe, recombinaison des chromosomes homologues, rétrocroisement et sélection (GILL and RAUPP 1987). Aucune manipulation cytogénétique n'est requise à l'exception du sauvetage d'embryon qui s'avère nécessaire pour produire l'hybride F₁ dans certains cas. Ce pool primaire inclut aussi les progéniteurs diploïdes de l'orge (HH, *Hordeum spontaneum*) et du seigle (RR, *Secale vavilovii*, *Secale montanum*) qui bien qu'appartenant à des espèces différentes et portant des génomes non homéologues sont sexuellement compatibles avec le blé (FEUILLET *et al.* 2008).

Les croisements interspécifiques et l'exploitation de la variabilité génétique entre le blé et ces espèces notamment dans le genre *Aegilops* ont été étudiés en même temps que les

relations phylogéniques, puisque des espèces du genre *Aegilops* sont impliquées dans l'évolution du génome du blé hexaploïde. Ces propriétés ont été utilisées pour réaliser de nouvelles hybridations entre des blés tétraploïdes et *Ae. tauschii* (JIANG *et al.* 1994) afin de produire des blés synthétiques qui réintroduisent de la diversité dans le pool cultivé. Plusieurs gènes ont été introduits dans le blé hexaploïde à partir d'*Ae. Tauschii*, le donneur du génome D (FRITZ *et al.* 1995). L'introgression des gènes directement dans le génome du blé tendre à partir du génome du blé tétraploïde a aussi été accomplie au cours de plusieurs études (HAYES *et al.* 1920; MCFADDEN and SEARS 1946; READER and MILLER 1991).

3.2.2. Groupe génétique secondaire

Ce groupe comprend des espèces proches notamment les espèces polyploïdes de *Triticum* et d'*Aegilops* telles que *T. timopheevii* (AAGG) qui contient un génome commun (AA) avec ceux du génome du blé tendre. Les espèces diploïdes d'*Aegilops* de la section Sitopsis qui sont proches du génome BB du blé font également partie de ce groupe du fait d'un appariement chromosomique réduit et de la difficulté de réalisation du transfert de gènes. Ce pool secondaire inclut aussi le tétraploïde *Hordeum bulbosum*, *Elymus* (HHStSt) et *Secale sylvestre* (FEUILLET *et al.* 2008; JIANG *et al.* 1994). Le transfert de gènes vers le génome du blé tendre peut être réalisé par hybridation directe et sélection si ceux-ci sont issus d'un des génomes homéologues du blé (A, B, D). S'ils proviennent d'un génome non homéologue, une manipulation cytogénétique supplémentaire est nécessaire comme dans le cas du groupe génétique tertiaire (*cf.* ci-dessous).

3.2.3. Groupe génétique tertiaire

Ce groupe inclut des espèces diploïdes et polyploïdes contenant des génomes non homéologues à ceux du génome du blé. Une large proportion d'espèces appartenant à ce groupe est pérenne et importante pour l'amélioration du blé. Il inclut des espèces de *Secale* (RR), *Thinopyrum* (EE), et *Hordeum bulbosum* (XX), mais aussi les orges américaines sauvages et *H. bogdanii*. Dans ce cas, le transfert génétique ne peut pas être réalisé par recombinaison homologue. Cependant, les génomes des espèces dans ce groupe sont génétiquement proches de ceux du génome du blé, et le transfert peut être réalisé par des techniques de cytogénétique ou par translocation chromosomique en utilisant l'irradiation ou la culture *in vitro*. L'un des meilleurs exemples de l'introgression d'une chromatine d'une espèce apparentée dans le génome du blé est la translocation chromosomique 1BL/1RS à partir du seigle. Seules quatre sources de transferts et de substitutions (deux mises au point en

Allemagne par Salzmunder et Weihenstephan entre 1920-1930, une développée au Japon dans les années 1960, et une développée aux Etats-Unis dans les années 1970) sont à l'origine des centaines de variétés commerciales du blé comportant cette translocation dans les différents pays (pour plus de détails voir RABINOVICH , 1998). Le bras court du chromosome 1R du seigle porte plusieurs gènes influençant le rendement du blé au travers de gènes de résistance à des pathogènes majeurs tels que la rouille brune (*Lr29*) et la rouille jaune (*Yr26*), et de gènes améliorant l'adaptation et la tolérance au stress, fournissant une masse aérienne supérieure et un poids de grains plus élevé (ZARCO-HERNANDEZ *et al.* 2005).

Enfin, l'une des réalisations les plus remarquables issue des hybridations blé-seigle est l'obtention de la première espèce hybride créée par l'homme, le Triticale (Triticosecale). Le premier hybride a été généré en Ecosse en 1876 mais il a fallu attendre 1938 avant de voir le premier hybride fertile (pour revue voir OETTLER 2005). L'objectif était de combiner les qualités du blé et la robustesse du seigle dans une nouvelle espèce, afin d'explorer de nouveaux marchés et exploiter des terres moins favorables à la production du blé ou de l'orge. La sélection et la production de Triticale n'ont réellement débuté que dans les années 1960 pour atteindre ~2 millions de tonnes dans les années 1980 et 13 millions de tonnes en 2005 (<http://faostat.fao.org/>).

Limites et solutions

- L'introggression d'un fragment d'ADN issu d'espèces proches sauvages ou cultivées dans le génome du blé peut présenter un inconvénient important surtout lorsque le fragment introgressé est de grande taille et porte des gènes ayant un effet négatif sur la variété ainsi créée. Ce phénomène de "linkage drag" a beaucoup limité l'efficacité de l'exploitation des espèces sauvages apparentées dans les programmes de sélection, car le processus visant à éliminer les effets négatifs des allèles adjacents au gène d'intérêt est long et laborieux.

- La recombinaison entre le chromosome apparenté introduit et ses homéologues est, en général, extrêmement restreinte et dépend du niveau de similarité entre les séquences. Pour surmonter ce problème, des techniques de génie chromosomique (chromosome engineering) ont été développées afin d'augmenter la fragmentation des chromosomes du donneur et ainsi favoriser leur recombinaison avec les génomes receveurs (ENDO 2007; FEDAK 1999; FEUILLET *et al.* 2008; JIANG *et al.* 1994; QI *et al.* 2007). Une meilleure connaissance de la structure du génome des Triticées, de la distribution de la recombinaison et de sa régulation permettra également dans le futur de développer des stratégies plus fines telles que « le remplacement d'allèle », par recombinaison spécifique de sites au travers de la séquence afin

de réduire l'effet des gènes qui peuvent être porté sur le fragment introgressé (FEUILLET *et al.* 2008).

- Le gène *Phl* qui régule l'appariement et la recombinaison entre les chromosomes homéologues (RILEY and CHAPMAN 1958 ; RILEY *et al.* 1959) a été caractérisé et sa structure récemment définie (GRIFFITHS *et al.* 2006). L'allèle *phl* a été largement exploité pour induire de la recombinaison homéologue et permettre de réduire la taille du segment introgressé afin d'éliminer certaines parties qui portent des gènes/allèles non désirables.

III. Déterminismes génétiques et physiologiques de l'aptitude au croisement

1. Définition

L'aptitude au croisement est définie comme la capacité de croiser des individus appartenant à la même espèce ou à différentes sous-espèces, espèces ou genres, et d'obtenir des embryons ou des grains qui peuvent, à leur tour, conduire à l'obtention de plantes F₁. Les plantes F₁ obtenues seront fertiles ou non selon le pool génétique auquel les deux parents appartiennent. A l'inverse, lorsqu'une barrière génétique intervient lors de la fécondation, la non-formation de l'albumen et/ou la mortalité de l'embryon qui s'ensuit résulte en une inaptitude au croisement.

2. Systèmes contrôlant l'inaptitude au croisement chez les plantes

En principe, le pollen germe sur la surface du stigma et forme un tube pollinique. Pendant que le tube pollinique se développe, il est en contact intime avec une matrice extracellulaire (Extracellular Matrix, ECM) sécrétée par le pistil qui crée un environnement structural et physiologique optimal pour la germination du pollen et la croissance de tube pollinique. Cette matrice a été bien caractérisée chez le genre *Nicotiana*. Elle contient des glycoprotéines riches en hydroxyproline (Hydroxyproline-rich glycoproteins, HRGPs) qui fournissent des sélections directionnelles pour les tubes polliniques croissants ainsi que des protéines impliquées dans l'identification et le rejet de l'auto-pollen. Ainsi, les interactions pollen-pistil impliquent plusieurs protéines qui remplissent une série de fonctions, et apportent les éléments nutritifs et les liquides nécessaires pour activer le métabolisme et initier l'élongation des tubes polliniques (SWANSON *et al.* 2004).

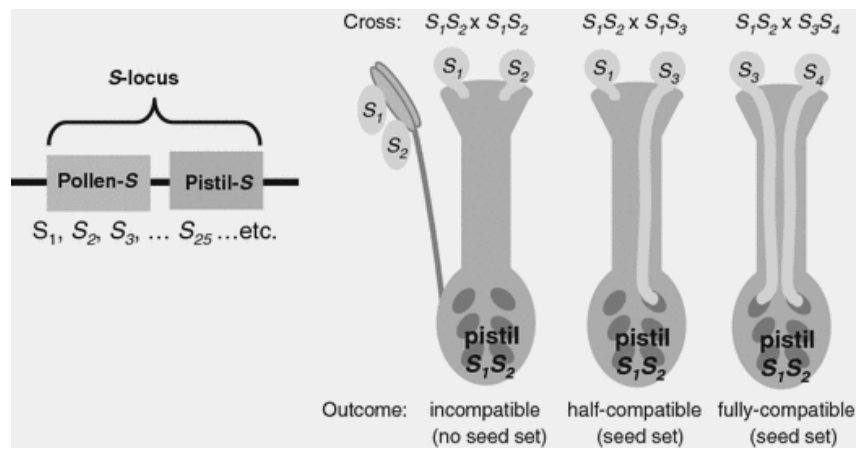


Figure 8 : Contrôle génétique du système gamétophytique (GSI). D'après MCCLURE and FRANKLIN-TONG (2006).

2.1. Contrôle de l'auto-incompatibilité intra-spécifique

L'auto-incompatibilité (SI, Self-Incompatibility) est un nom général qui englobe plusieurs mécanismes ou « systèmes » génétiques chez les angiospermes. Ces systèmes empêchent l'auto-fécondation et favorisent ainsi la pollinisation croisée. Chez les plantes possédant un système d'auto-incompatibilité, le processus de germination du pollen, de croissance du tube pollinique, fécondation de l'ovule et de développement de l'embryon est arrêté lorsqu'un grain de pollen atteint le stigma de la même plante ou d'une autre plante avec un génotype similaire et aucune semence n'est produite.

Les mécanismes les mieux étudiés de systèmes de l'auto-incompatibilité (SI) agissent en inhibant la germination du pollen sur le stigma ou l'élongation du tube pollinique dans les styles. Ils sont basés sur des interactions protéine-protéine, gouvernées par un seul locus appelé le locus *S* (*S*-locus), qui comprend de nombreux allèles dans une même espèce. Malgré des manifestations morphologiques et génétiques semblables, les mécanismes d'auto-incompatibilité ont évolué de façon indépendante dans les différentes espèces, chaque locus *S* étant unique et les interactions étant basées sur des composants cellulaires différents (DEBORAH *et al.* 2005).

Le locus *S* contient deux régions codantes pour des protéines *S*, dont l'une est exprimée dans le pistil (déterminant femelle, gamétophytique, GSI), et l'autre dans le pollen (déterminant mâle, Sporophytique, SSI). En raison de leur proximité physique, les deux composantes sont génétiquement liées, et héritées en une seule unité. Les deux protéines interagissent l'une avec l'autre pour provoquer l'arrêt de germination du pollen et/ou l'élongation du tube pollinique. Cependant, quand le déterminant femelle interagit avec un déterminant mâle d'un haplotype différent, le système d'auto-incompatibilité n'est pas efficace, et la fécondation se produit.

2.1.1. Auto-incompatibilité gamétophytique (GSI)

Le système d'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI) est retrouvé dans de nombreuses familles e.g *Solanaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*, *Campanulaceae*, *Leguminosae*, *Onagraceae*, *Scrophulariaceae*, *Rosaceae* et *Poaceae* (BREWBAKER 1957; FRANKLIN *et al.* 1985; IGIC and KOHN 2001).

Dans le système GSI, l'auto-incompatibilité est habituellement déterminée par le génotype du pollen (Figure 8). Chez la plante S_1S_2 , la moitié des pollens possède l'haplotype S_1 et l'autre moitié l'haplotype S_2 . Quand il y a correspondance entre l'haplotype-*S* du pollen

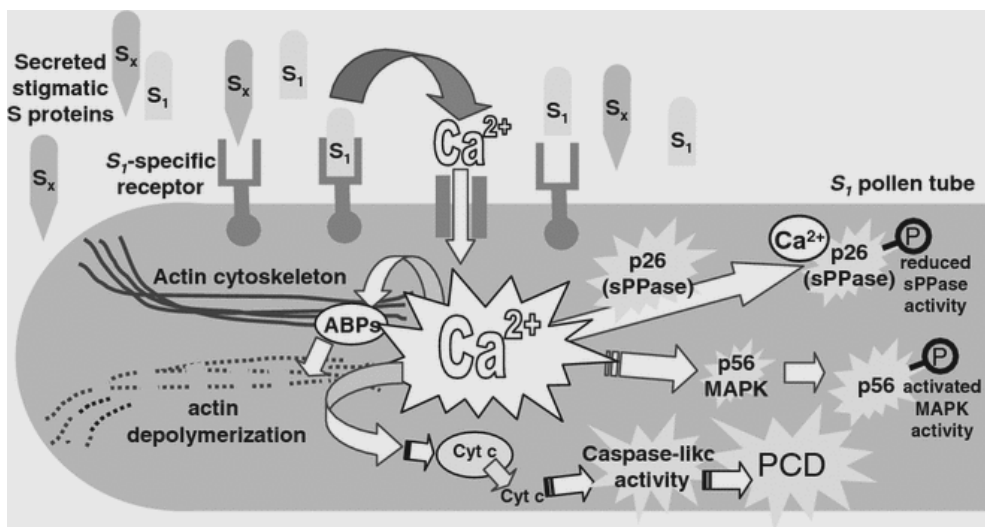


Figure 9 : Modèle du mécanisme cellulaire impliqué dans le system GSI chez le coquelicot (*Papaver rhoeas*). D'après MCCLURE and FRANKLIN-TONG (2006).

et l'un ou l'autre des deux haplotypes présents dans le pistil, une réaction incompatible se produit.

Trois classes de réaction sont observées avec ce système : incompatible (tout le pollen est inhibé), semi-compatible (50% inhibé, 50% se développe normalement) ou compatible (tout le pollen se développe normalement) (MCCLURE and FRANKLIN-TONG 2006)(Figure 8). Deux mécanismes de GSI ont été décrits en détail au niveau moléculaire :

2.1.1.1. *Le mécanisme RNase S*

Dans ce mécanisme, lorsque les allèles *S* femelles et mâles sont identiques l'elongation du tube pollinique est arrêtée à environ un tiers du chemin à travers le style probablement au travers du composant ribonucléase de la femelle, appelée *S*-RNase (MCCLURE *et al.* 1989) qui dégrade l'ARN ribosomal (ARNr) à l'intérieur du tube pollinique (FRANKLIN-TONG and FRANKLIN 2003). Les composants mâles ont été récemment identifiés comme des protéines membres de la famille "F-box" (SIJACIC *et al.* 2004). Les membres de ce groupe, fonctionnent généralement comme des ubiquitine ligases qui reconnaissent les molécules de RNase-*S* correspondantes et les dirigent vers une dégradation protéasomique qui inhibe ainsi la fécondation.

2.1.1.2. *Le mécanisme protéine S*

Ce mécanisme a été décrit en détail chez le coquelicot (*Papaver rhoeas*). L'interaction entre les déterminants mâles et femelles induit un signal cellulaire envoyé dans le tube pollinique qui résulte en un fort afflux des cations de calcium. Celui-ci interfère ensuite avec le gradient de concentration intracellulaire des ions calcium à l'intérieur du tube pollinique qui est essentiel pour son elongation (FRANKLIN-TONG *et al.* 1997; FRANKLIN-TONG *et al.* 2002; FRANKLIN-TONG *et al.* 1993).

Le pollen incompatible subi une interaction spécifique d'allèles (liaison de la protéine stigmatique *SI* à un pollen récepteur *SI*, Figure 9), et déclenche une cascade de signalisation de Ca^{2+} intracellulaire impliquant des afflux de Ca^{2+} à large échelle (Figure 9). Deux cibles sont rapidement modifiées : (1) Pr-p26 (une protéine cytosolique 26 kDa) est phosphorylée et l'activité de sa pyrophosphatase est inhibée, (2) et le filament d'actine est réorganisé et dépolymérisé. Les deux causent un arrêt rapide du développement du tube pollinique. Puis, la p56-MAPK (mitogen activated protein kinase) est activée et peut signaler la mort programmée de la cellule (PCD). La PCD est déclenchée impliquant la fuite du cytochrome c (*Cyt c*) et la défragmentation d'ADN (MCCLURE and FRANKLIN-TONG 2006).

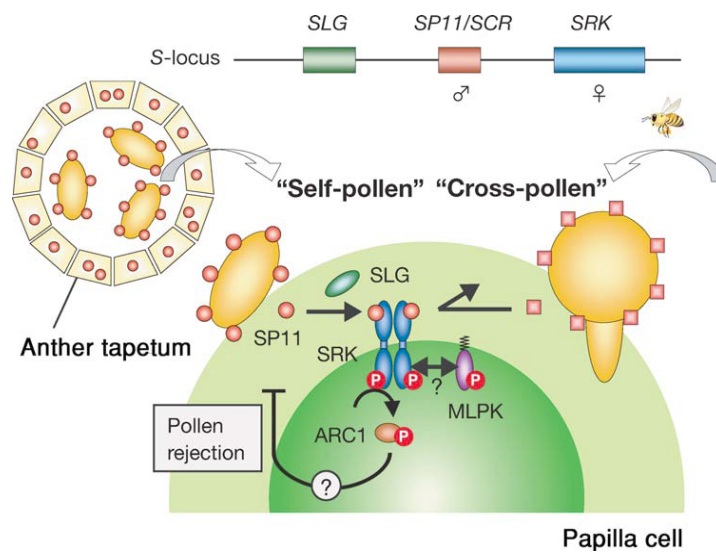


Figure 10 : Modèle moléculaire de la réponse à l'auto-incompatibilité (SI) chez les *Brassicaceae*. Le locus S est constitué de trois gènes, SRK, SP11, et SLG. Le récepteur kinase SRK est le facteur déterminant femelle et couvre la membrane plasmique de la cellule de la papille stigmatique. SP11 est le déterminant mâle et il est essentiellement exprimé dans le tapis de l'anthere où il s'accumule dans la couche extérieure du pollen au cours de la maturation du pollen. D'après TAKAYAMA and ISOGAI (2005).

2.1.2. Auto-incompatibilité Sporophytique (SSI)

Dans l'auto-incompatibilité sporophytique (SSI, Sporophytic Self-Incompatibility), le phénotype auto-incompatible du pollen est déterminé par le génotype diploïde de l'anthère (le sporophyte).

Cette forme d'auto-incompatibilité a été identifiée chez les *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Sterculiaceae* et *Polemoniaceae*. Dans le SSI, le pollen et le pistil, produisent, respectivement deux déterminants mâles et deux déterminants femelles. La relation de dominance existe souvent entre paires d'allèles, ce qui complique les modes de compatibilité ou d'auto-incompatibilité. Ces relations de dominance permettent la génération d'individus homozygotes pour l'allèle récessif. Par rapport à une population dont tous les allèles *S* seraient co-dominants, la dominance augmente les chances de compatibilité entre les individus (HISCOCK and TABAH 2003). Le taux de fréquence entre allèles *S* récessifs et dominants, reflète un équilibre dynamique entre l'assurance de la reproduction (favorisée par des allèles récessifs) et à la prévention des autofécondations (favorisée par les allèles dominants) (OCKENDON 1974). Le mécanisme d'auto-incompatibilité sporophytique (SSI) a été décrit en détail chez les *Brassicaceae*. Les études ont montré que le déterminant mâle, appelé SCR ou SP11 (Figure 10) est exprimé dans le tapis de l'anthère (c'est-à-dire sporophytiquement), ainsi que dans les microspores et le pollen (c'est-à-dire gamétophytiquement) (SCHOPFER *et al.* 1999; TAKAYAMA *et al.* 2000). Il correspond à de petites protéines riches en cystéine.

Le déterminant femelle est une protéine transmembranaire appelé SRK (*S*-receptor kinase, Figure 10), qui possède un domaine kinase intracellulaire, et un domaine extracellulaire variable (NASRALLAH and NASRALLAH 1993; STEIN *et al.* 1991). SRK est exprimé dans le stigmate, et fonctionne probablement comme un récepteur pour les protéines SCR/SP11 dans la couche extérieure du pollen. Une autre protéine stigmatique, appelée SLG (Figure 10), très similaire à SRK, semble fonctionner comme un co-récepteur pour le déterminant mâle, amplifiant ainsi la réponse auto-incompatible (TAKASAKI *et al.* 2000). L'interaction entre les protéines SRK et SCR/SP11 résulte en une autophosphorylation du domaine kinase intracellulaire de SRK (SCHOPFER and NASRALLAH 2000; TAKAYAMA *et al.* 2001) et un signal est transmis dans les cellules des papilles du stigmate. Une autre protéine essentielle pour la réponse à SI est MLPK (M-locus protéine kinase, Figure 10), une sérine-thréonine kinase, qui est ancrée à la membrane plasmique de son côté intracellulaire (MURASE *et al.* 2004). Après autopollinisation, l'interaction de l'haplotype *S* spécifique entre SP11 du

Tableau 2 : Sous-familles de graminée et tribus dans les quelles l'auto-incompatibilité (SI) a été identifié, d'après BAUMANN *et al.* (2000); CONNOR (1979) et LI *et al.* (1997).

Sous-famille	Tribu	Espèce	Auto-incompatibilité
Pooideae	Poeae	<i>Briza media</i>	Oui
		<i>Briza minor</i>	Non
		<i>Cynosurus cristatus</i>	Oui
		<i>Dactylis aschersoniana</i>	Oui
		<i>Festuca pratensis</i>	Oui
		<i>Lolium perenne</i>	Oui
		<i>Lolium multiflorum</i>	Oui
		<i>Lolium rigidum</i>	Non
		<i>Anthoxanthum odoratum</i>	Oui
		<i>Avena barbata</i>	Non
		<i>Phalaris coerulescens</i>	Oui
		<i>Secale cereale</i>	Oui
		<i>Hordeum bulbosum</i>	Oui
		<i>Hordeum vulgare</i>	Non
		<i>Triticum aestivum</i>	Non
Panicoideae	Andropogoneae	<i>Sorghastrum nutans</i>	Oui
		<i>Themeda australis</i>	Non
		<i>Zea mays</i>	Non
Chloridoideae	Chlorideae	<i>Chloris gayana</i>	Oui
		<i>Chloris striate</i>	Non
Arundinoideae	Danthonieae	<i>Danthonia linkii</i>	Non
		<i>Molinia caerulea</i>	Oui
Bambusoideae	Oryzeae	<i>Oryza barthii</i>	Oui
		<i>Oryza sativa</i>	Non

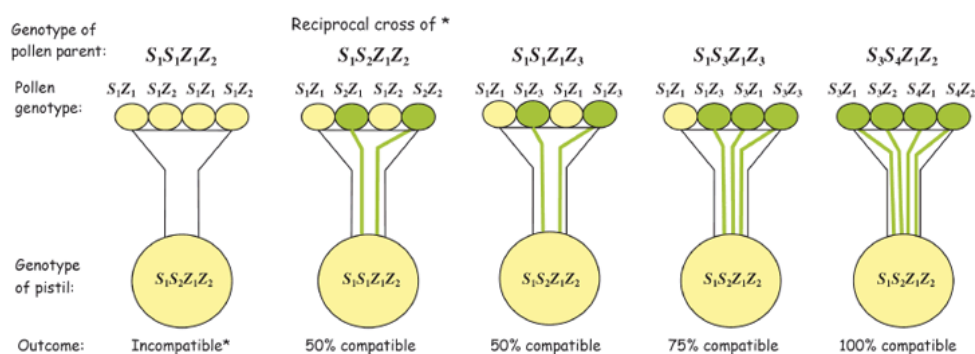


Figure 11: Contrôle génétique de l'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI) par deux locus multi-allélique *S* et *Z*. D'après BICHENG *et al.* (2008).

pollen et SRK du stigmate induit la signalisation de l'auto-incompatibilité dans la cellule de la papille stigmatique et résulte dans le rejet de l'auto-pollen (KAKITA *et al.* 2007; TAKAYAMA and ISOGAI 2005).

2.1.3. Mécanisme d'auto-incompatibilité (SI) chez les graminées

La promotion de l'hybridation externe par le système d'auto-incompatibilité a joué un rôle important dans l'évolution et la diversification des espèces de graminées (PANDEY 1977). L'efficacité du système d'auto-incompatibilité chez les graminées se limite, dans une certaine mesure, à l'efficacité de la production de lignées pures et hybrides en sélection végétale, mais il assure aussi le maintien d'hétérozygotie dans les populations sauvages et il pourrait avoir contribué potentiellement aux succès d'adaptation chez ces espèces. L'auto-incompatibilité est largement répandue chez les graminées et au moins 16 genres auto-incompatibles ont été identifiés au sein de cinq des treize sous-familles des *Poaceae* (BAUMANN *et al.* 2000; CONNOR 1979) (*cf.* tableau 2).

Des études sur le seigle *Secale cereale* par LUNDQVIST (1954) et sur *Phalaris coerulescens* par HAYMAN (1956) ont montré que l'auto-incompatibilité chez les graminées est contrôlée gamétophytiquement par au moins deux locus multi-alléliques et indépendants, *S* et *Z*. L'incompatibilité du phénotype du grain de pollen est déterminée par son génome haploïde et dépend de la combinaison d'allèles *S* et *Z* dans le grain de pollen. Un grain de pollen est incompatible lorsque ses deux allèles *S* et *Z* sont présents dans le pistil (Figure 11). Le degré de compatibilité peut être de 50, 75 ou 100%, selon les génotypes du pollen et du stigmate. Dans les cas 1 et 2 (à gauche dans la Figure 11), le sens de croisement peut déterminer le devenir du phénotype. Si un pollen de génotype $S_1S_1Z_1Z_2$ est croisé avec un pistil portant le génotype $S_1S_2Z_1Z_2$, le pollen est incompatible, alors qu'un génotype $S_1S_2Z_1Z_2$ sur un pistil $S_1S_1Z_1Z_2$, donnera 50% de compatibilité (BICHENG *et al.* 2008).

2.2. L'aptitude au croisement entre sous espèces (exemple du riz)

2.2.1. Analyses génétiques

Le riz d'Asie (*Oryza sativa* L.) cultivé dans le monde est divisé en deux sous-espèces majeures, *indica* (*O. sativa* ssp. *indica*) et *japonica* (*O. sativa* ssp. *japonica*). Les hybrides entre *japonica* et *indica* montrent généralement de faibles taux de fertilité. Seul un groupe de riz d'Asie appelé "Wide-Compatibility Varieties, WCV" est capable de produire des hybrides fertiles après croisement entre *indica* et *japonica* (IKEHASHI and ARAKI 1984). Les analyses génétiques ont identifié un grand nombre de locus affectant la fertilité de ces hybrides. LIU *et*

al. (2000) ont identifié trois QTL : *esa-1* sur le chromosome 6 et *esa-2* et *esa-3* sur le chromosome 12 du riz. Les auteurs ont montré que l'arrêt du développement du sac embryonnaire, suite à l'hybridation entre *O. sativa* ssp. *indica* var. ZYQ8 et *O. sativa* ssp. *japonica* var. JX17, se manifeste après la méiose dans l'hybride F₁. Quand le mégaspore porte le génotype létal, le noyau n'est pas divisé ou il n'est divisé qu'une seule fois puis le sac embryonnaire immature dégénère. Dans un autre exemple, KUBO *et al.* (2008) rapportent que la stérilité mâle de l'hybride est causée par une interaction épistatique entre deux gènes *S*₂₄ et *S*₃₅ identifiés sur les chromosomes 5 et 1, respectivement. Un autre locus, *S*₁, responsable de la barrière de reproductivité entre les deux riz cultivés *O. sativa* d'Asie et *O. glaberrima* d'Afrique a été génétiquement cartographié en utilisant des lignées quasi isogéniques dans un intervalle de 40kb sur le chromosome 6 (KOIDE *et al.* 2008). Un autre gène, *S*₃₁, responsable de l'avortement du sac embryonnaire de l'hybride résultant du croisement entre les deux sous-espèces du riz *indica* et *japonica*, a été localisé sur le chromosome 5 (ZHAO *et al.* 2007). Finalement, le gène *S*_{32(t)} qui cause la stérilité de l'hybride entre « populations de pays » de riz chinois a été localisé sur le chromosome 2 (LI *et al.* 2007). Ces résultats illustrent la complexité du contrôle de la fertilité dans les croisements interspécifiques chez le riz.

2.2.2. Analyses moléculaires

*S*₅, localisé sur le chromosome 6 de riz, est un locus majeur pour la stérilité de l'hybride *indica/japonica* (IKEHASHI and ARAKI 1988). Trois allèles ont été identifiés, un chez *indica* (*S*_{5-i}), un chez *japonica* (*S*_{5-j}) et un allèle neutre (*S*_{5-n}), qui est considéré comme le gène de compatibilité inter sous-spécifique entre *indica* et *japonica*. Les combinaisons entre ces trois types d'allèles déterminent le devenir de l'hybride. Une plante issue du zygote portant la combinaison (*S*_{5-n}/*S*_{5-i}) ou (*S*_{5-n}/*S*_{5-j}) est complètement fertile, tandis qu'une plante avec la combinaison (*S*_{5-i}/*S*_{5-j}) est stérile (YANAGIHARA *et al.* 1995; LIU *et al.* 1997; QIU *et al.* 2005). La stérilité de l'hybride (*S*_{5-i}/*S*_{5-j}) est principalement causée par l'avortement du gamète femelle (QIU *et al.* 2005; SONG *et al.* 2005).

Le gène *S*₅ vient d'être isolé, il code pour une protéase aspartique (AP) (CHEN *et al.* 2008). Chez *Arabidopsis*, l'AP codé par le gène *PCSI* (Promotion of Cell Survival 1) est impliquée dans la résistance des gamétophytes mâles et femelles à la mort cellulaire pendant le développement des embryons (GE *et al.* 2005). Chez le riz, les trois formes d'allèles diffèrent dans leur composition nucléotidique : les allèles d'*indica* (*S*_{5-i}) et de *japonica* (*S*_{5-j}) diffèrent de deux nucléotides, l'allèle neutre (*S*_{5-n}) présente une délétion large dans la partie N-

terminale de la protéine, ce qui pourrait causer une mauvaise localisation subcellulaire (CHEN et al. 2008).

2.3. L'aptitude au croisement interspécifique (exemple du blé)

L'obtention d'un hybride F₁ après croisement entre le blé et une espèce apparentée est le premier des pré-requis nécessaires au transfert d'un gène étranger chez le blé. L'une des premières études publiées sur l'aptitude au croisement entre le blé et d'autres espèces date d'environ un siècle. BACKHOUSE (1916) en travaillant sur des croisements blé/seigle a été le premier à montrer que l'aptitude au croisement interspécifique était récessive. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par LEIGHTY and SANDO (1928); MEISTER and TJUMJAKOFF (1928); TAYLOR and QUISENBERRY (1935) et RILEY and CHAPMAN (1967).

En général, les croisements entre le blé et le seigle réussissent quand le blé est utilisé comme parent femelle, alors que le croisement est difficile dans le sens réciproque (JALANI and MOSS 1980). Le succès d'une hybridation dépend de l'aptitude du génotype de blé utilisé pour le croisement interspécifique. TOZU (1966) a classé les variétés de blé hexaploïde, *T. aestivum*, selon leur aptitude au croisement avec le seigle : haute (47-66%), moyenne (17-20%) ou faible (0-10%). LANGE and WOJCIECHOWSKA (1976) ont comparé les taux d'aptitude au croisement avec le seigle de 177 variétés de blé tendre. Ils ont trouvé que les variétés présentant plus de 25% d'aptitude étaient originaires d'Argentine, du Brésil, de Chine, d'Iran, du Japon et de Yougoslavie, et que les variétés avec environ 20% d'aptitude étaient originaires du Mexique et de l'Inde. Une autre étude sur la distribution géographique des blés croisables (ZEVEN 1987) a montré, par comparaison de 1400 variétés et lignées, que la majorité des blés aptes au croisement avec le seigle étaient originaires de Chine, du Japon, d'Iran et de Sibérie, indiquant une origine majoritairement asiatique de l'aptitude au croisement blé x seigle.

2.3.1. Physiologie de l'aptitude au croisement chez le blé tendre.

Plusieurs études ont été menées pour tenter d'identifier le site d'action des gènes inhibiteurs dominants de l'aptitude au croisement entre le blé et le seigle ou *H. Bulbosum*. Les résultats indiquent que le pollen de seigle ou d'orge germe normalement après son arrivée sur le stigmate de blé et que des différences entre variétés croisables et non croisables apparaissent plus tard lors de la croissance des tubes polliniques et au moment de la fécondation de l'ovaire (Figure 12). Aucune différence significative n'a été observée ni dans la vitesse de germination des grains de pollen (TOZU 1966; ZEVEN and VAN HEEMERT 1970; LANGE and WOJCIECHOWSKA 1976; JALANI and MOSS 1980), ni dans le nombre moyen de

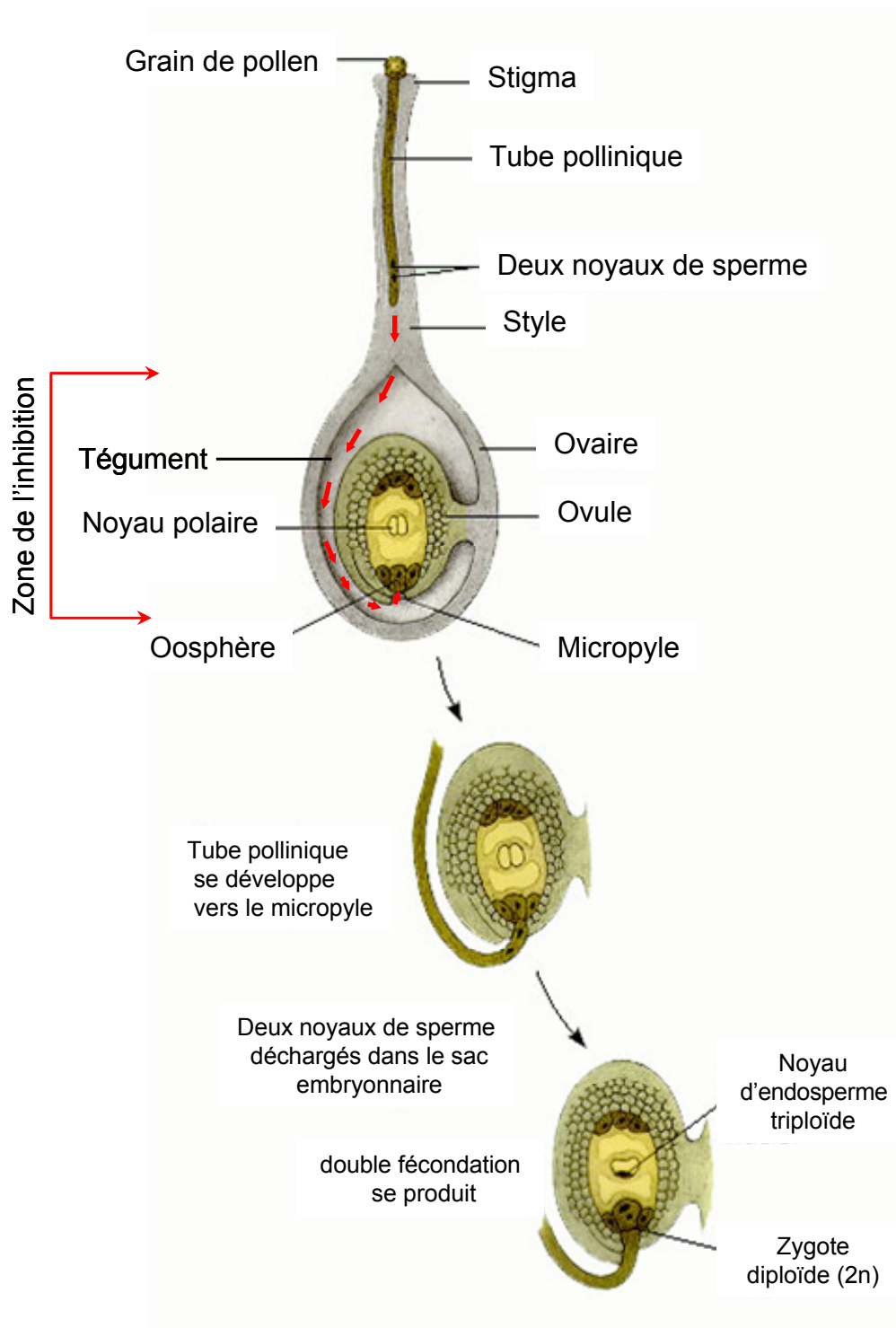


Figure 12 : Représentation schématique du parcours du tube pollinique pendant son développement, vers le micropyle et la fécondation.

grains de pollen germés (LANGE and WOJCIECHOWSKA; 1976 JALANI and MOSS 1980) entre des contrôles blé x blé et des croisements blé x seigle. JALANI and MOSS (1980) ont parfois observé que la lignée de substitution CS/Hope 5B (très faiblement croisable) montrait une moyenne plus élevée du nombre de grains de pollen germés que Chinese Spring (hautement croisable) ce qui confirme que l'inhibition ne se produit pas au moment de la germination des grains de pollen. Aucune différence n'a également été rapportée quant à la vitesse de développement des tubes polliniques, et dans certains cas, le développement des tubes polliniques du seigle est même plus rapide que celui des pollens de blé.

Le nombre de tubes polliniques a également été comparé. JALANI and MOSS (1980) ont ainsi déterminé le nombre de tubes polliniques du stigma au micropyle, ½, 3/4, 1, 2, 5, 6 et 12h après pollinisation. Leurs résultats ne montrent à nouveau aucune différence significative du nombre de tubes polliniques dans le style et à la base du style entre les contrôles blé x blé et les croisements blé x seigle. Par contre, des différences significatives ont été observées dans le temps nécessaire pour que le nombre de tubes polliniques atteigne son maximum dans le haut et le milieu du sac embryonnaire et le micropyle avec des variations selon le génotype étudié. Ce maximum est atteint 1h après pollinisation dans le cas du contrôle (blé x blé) et seulement entre 2 et 6 h dans le cas des croisements blé x seigle. Finalement, JALANI and MOSS (1980) montrent une forte corrélation ($r = 0.97$, $P > 0.01$) entre le nombre de micropyles contenant des tubes polliniques et le nombre des grains formés indiquant ainsi que la différence d'aptitude au croisement inter-générique entre variétés de blé et donc probablement le mode d'action des gènes inhibiteurs de l'aptitude au croisement se situent à ce niveau.

Ainsi, lorsque les tubes polliniques s'allongent et commencent à traverser le style, les taux de développement des tubes polliniques diffèrent entre variétés aptes et inaptes au croisement et les tubes polliniques lents n'atteignent jamais la base du style (LANGE and WOJCIECHOWSKA 1976; JALANI and MOSS 1980). En conclusion, il semble que l'absence de fécondation soit la cause majeure du faible nombre de grains obtenus dans les variétés inaptes au croisement.

2.3.2. Génétique de l'aptitude au croisement interspécifique chez le blé tendre

Au cours des cinq dernières décennies plusieurs gènes/QTLs impliqués dans l'aptitude du blé au croisement avec d'autres espèces, surtout le seigle, ont été identifiés. Ces gènes

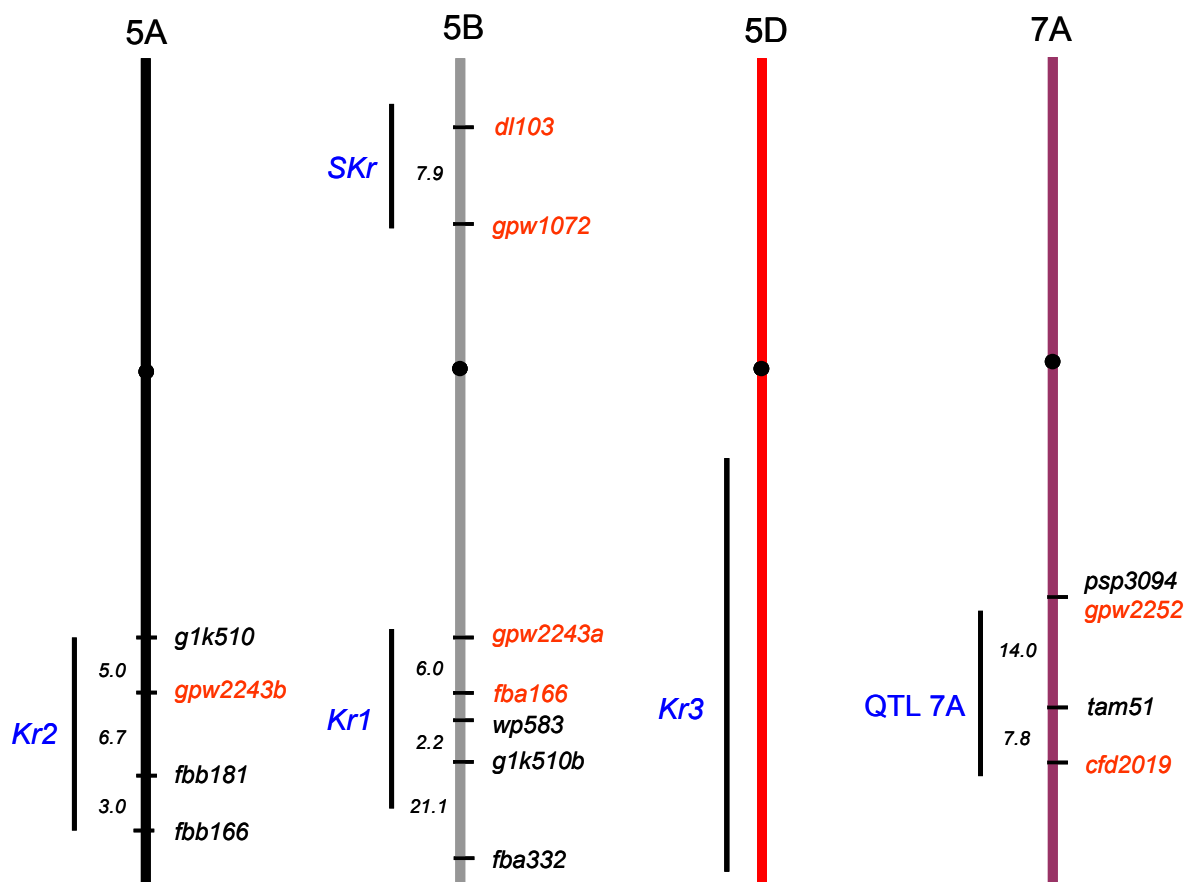


Figure 13 : Cartographie génétique des principaux gènes affectant l'aptitude au croisement entre le blé et le seigle. D'après LAMOUREUX *et al.* (2002)

diffèrent par leurs effets sur l'inhibition de la fécondation qui est généralement évaluée au travers de l'analyse après fécondation, du développement de l'albumen et du nombre de grains obtenu (KROLOW 1970).

2.3.2.1. Les gènes *Kr* (*Kr1*, *Kr2* et *Kr3*)

En 1943, Lein met en évidence l'existence de deux gènes, *Kr1* et *Kr2* impliqués dans l'aptitude au croisement interspécifique entre le blé tendre et le seigle. L'auteur suggère que la variété "Chinese 466" qui porte les allèles *kr1kr1kr2kr2* est apte au croisement interspécifique, tandis que d'autres variétés qui portent soit les allèles *Kr1Kr1kr2kr2* soit les allèles *Kr1Kr1Kr2Kr2* sont peu ou pas aptes au croisement. Enfin, cette première étude conclut que le gène *Kr1* a un effet plus marqué sur la réduction en nombre de grains que le gène *Kr2*.

Les chromosomes portant les gènes *Kr1* et *Kr2* sont restés inconnus jusqu'à l'étude menée par RILEY and CHAPMAN (1967). Dans celle-ci, les auteurs ont utilisé les variétés Chinese Spring (hautement apte au croisement avec le seigle) et Hope (inapte au croisement) ainsi que 21 lignées de substitution (Figure 4) de Chinese Spring/Hope correspondant aux 21 chromosomes du blé tendre. Les taux d'aptitude au croisement des lignées de substitution CS/Hope 5A et CS/Hope 5B étaient de 26.2% et 6.4% respectivement, tandis que Chinese Spring et les autres lignées présentaient des taux d'aptitude allant jusqu'à 74.3%. Les auteurs concluent que *Kr1* porté par le chromosome 5B de la variété Hope agit comme un inhibiteur de l'aptitude au croisement avec le seigle tandis que *kr1* sur le chromosome 5B de la variété Chinese Spring est un promoteur de croisement. Six ans plus tard, LANGE and RILEY (1973) réalisent une analyse de lignées télosomiques (Figure 4) et localisent *Kr1* sur le bras long du chromosome 5B et *Kr2* sur le bras long du 5A (Figure 13), notons que le bras court 5BS n'existant pas, il n'a pu être testé. Ils confirment également que l'effet de *Kr1* est plus fort que celui de *Kr2*. Enfin, un troisième gène d'aptitude *Kr3* a été détecté sur le chromosome 5D, il présente un effet moindre sur l'aptitude au croisement que les autres gènes *Kr1* et *Kr2* (KROLOW 1970)(Figure 13).

Plusieurs études ont montré que le système gouvernant l'aptitude au croisement avec l'orge est vraisemblablement le même système que celui qui contrôle l'aptitude du croisement du blé avec le seigle. SNAPE *et al.* (1979) ont ainsi étudié le résultat de croisements entre le blé tendre et l'orge sauvage *Hordeum bulbosum* en utilisant les mêmes lignées que celles de

leur étude précédente (RILEY and CHAPMAN 1967) (i.e. Chinese Spring, Hope et 21 lignées de substitution Chinese Spring/ Hope). Ils mettent en évidence un effet important des chromosomes 5B (*Kr1*), 5A (*Kr2*) et 5D (*Kr3*) sur l'aptitude au croisement du blé avec l'orge bien que les taux observés soient significativement plus faibles qu'avec le seigle. L'effet plus important dans le cas de la lignée de substitution Chinese Spring/Hope 5B suggère que l'aptitude du blé au croisement avec le seigle et l'orge est gouverné par le même système, résultats confirmés plus tard par FEDAK and JUI (1982) et FALK and KASHA (1983). Enfin, SITCH *et al.* (1985) cartographient les gènes gouvernant l'aptitude du blé au croisement avec *Hordeum bulbosum* sur le bras long des chromosomes 5B (*Kr1*) et 5A (*Kr2*). Enfin, le faible effet du gène *Kr3* détecté sur le chromosome 5D par KROLOW (1970) a été confirmé par d'autres études mentionnant que ce gène n'affecte que peu ou pas l'aptitude au croisement blé/seigle ou blé/*H. bulbosum* (SNAPE *et al.* 1979; FALK and KASHA 1983; ZHENG *et al.* 1992).

2.3.2.2. Le gène *SKr*

En 1998, un nouveau locus, nommé *SKr*, contrôlant l'inaptitude au croisement entre le blé hexaploïde, *T. aestivum*, et le seigle, *S. cereale*, est détecté par une analyse QTL sur une population de cartographie génétique de 187 lignées haploïdes doublés (HD) issue du croisement entre la variété française non croisable « Courtot » et la variété chinoise hautement croisable « Chinese Spring » (TIXIER *et al.* 1998). *SKr* est identifié comme un QTL majeur (22.1% d'héritabilité) localisé sur le bras court du chromosome 5B (5BS) (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002), et plus particulièrement dans la partie distale dans un intervalle de confiance de 8.7 à 20.9 cM (LAMOUREUX *et al.* 2002) (Figure13). Un autre QTL est également mis en évidence sur le bras long du chromosome 5B (Figure 13) qui pourrait être *Kr1* mais dont l'effet (5.5% d'héritabilité) est bien moindre que celui de *SKr* dans cette population. Aucun effet significatif n'est observé sur le chromosome 5AL où *Kr2* a été précédemment identifié par LEIN (1943) et RILEY and CHAPMAN (1967). L'objet de la thèse porte sur le clonage et la caractérisation de ce QTL majeur et sera détaillé ultérieurement.

2.3.2.3. Autres gènes

D'autres études sur l'aptitude au croisement entre le blé et le seigle. MILLER *et al.* (1983) ont indiqué que les chromosomes du groupe d'homéologie 3 pourraient porter des facteurs qui affectent l'aptitude au croisement entre le blé tendre «cv.

Chinese Spring » et *Hordeum bulbosum*, résultats confirmés ensuite par ROMERO and CUADRADO (1992) qui observent un effet des chromosomes 3D et 3B. Un autre gène, nommé *Kr4*, a été identifié sur le chromosome 1A (ZHENG *et al.* 1992) avec un effet moins fort que *Kr1* mais plus fort que *Kr2*. Finalement, lors de l'identification du QTL majeur *SKr* sur 5BS, LAMOUREUX *et al.* (2002) et TIXIER *et al.* (1998) ont aussi détecté l'existence d'un QTL sur le bras long du chromosome 7A (Figure 13) avec semble-t-il un effet plus fort que le gène *Kr1* dans la population HD issue du croisement entre Courtot et Chinese Spring.

Aucun de ces gènes n'ayant été isolé, aucune étude moléculaire n'a pu être réalisée à ce jour et les bases moléculaires de l'aptitude au croisement entre le blé et le seigle ou *H. Bulbosum* restent totalement inconnues. L'objectif du travail de thèse est de contribuer au clonage du premier gène d'aptitude au croisement chez le blé.

IV. Méthodologies de clonage de gènes

L'un des principaux objectifs de la génétique moléculaire est d'identifier et d'isoler les gènes gouvernant des caractères d'intérêt. Plusieurs approches peuvent être utilisées en fonction du degré de connaissance du gène cible. La génétique directe permet de cheminer du phénotype au gène sans aucune connaissance préalable de la séquence du gène cible alors que la génétique inverse suppose la disponibilité de gènes candidats et chemine du gène au phénotype au travers d'analyses de mutants. Le clonage positionnel (ROMMENS *et al.* 1989; TANKSLEY *et al.* 1995) et la mutagenèse d'insertion (BECHTOLD *et al.* 1993) ont été utilisés avec succès ces dernières années pour isoler des gènes majeurs dans de nombreuses espèces d'intérêt agronomiques dont le blé (KRATTINGER *et al.* 2009). De plus, la génomique comparative et la disponibilité croissante de séquences de génomes entiers grâce aux nouvelles technologies de séquençage font de l'utilisation de la colinéarité entre les espèces apparentées une ressource importante pour les approches de clonage positionnel. Nous aborderons ici en détail différentes techniques de clonage de gènes.

1. Stratégie « gène candidat »

Cette stratégie est basée sur l'identification de gènes sur la base d'évidences indirectes telles que l'homologie avec un gène déjà connu pour être impliqué dans le phénotype étudié ou sur la base d'une expression différentielle du gène cible.

1.1. Identification de gènes candidats par homologie

Le gène candidat peut être choisi parmi les gènes clonés disponibles dans les bases de données et connus pour être impliqué dans le caractère étudié. S'il n'y a pas de séquences disponibles pour le gène dans l'espèce étudiée, il est possible de chercher la séquence correspondante chez une autre espèce (souvent une espèce modèle) puis générer des amorces permettant d'amplifier le gène candidat chez l'espèce cible. Cette approche a été particulièrement employée dans les années 2000 pour l'identification de gènes de résistances aux maladies chez les plantes. Au niveau moléculaire, les gènes de résistance (R-gènes) sont hautement conservés en particulier ceux appartenant à la classe des NBS-LRR (BENT 1996). Les motifs d'acides aminés consensus des domaines NBS, LRR et Kinase, ont été utilisés pour générer des amorces et amplifier des analogues de gènes de résistance (RGA) (PFLIEGER *et al.* 1999; MOHLER *et al.* 2002). MAGO *et al.* (1999) ont ainsi dessiné des oligonucléotides dégénérés à partir des motifs NBS (Nucleotide-Binding-Site) conservés entre les gènes de résistance d'*Arabidopsis*, de lin et de tabac, puis ils les ont utilisés comme amorces PCR pour amplifier des gènes analogues (RGA) chez le riz. Le produit amplifié a été fragmenté, les fragments obtenus cartographiés sur 5 chromosomes différents (2, 3, 4, 5 et 11) du riz en position associée avec des gènes de résistance identifiés lors d'études antérieures. Cette stratégie a aussi été appliquée chez les Triticées, les RGA clonés ont été cartographiés dans des régions contenant des gènes de résistance (MOHLER *et al.* 2002) mais sans mener à l'isolement d'un gène validé.

L'identification de gènes par homologie de séquence est en revanche très efficace pour les gènes impliqués dans le développement de la plante, processus très conservé chez les graminées. Par exemple, les orthologues du gène de nanisme *Sd1* chez le riz (MONNA *et al.* 2002) ont été clonés chez le blé (*Rht-1*) et le maïs (*D8*) (PENG *et al.* 1999).

Lorsque les gènes candidats sont identifiés, il faut tester leur localisation par cartographie génétique pour vérifier qu'ils sont bien dans la région cible, et éventuellement rechercher une variabilité allélique dans une collection de variétés pour voir si elle est corrélée à celle observée pour le caractère cible (GOLDMAN *et al.* 1993). La validation finale peut être obtenue par transformation génétique.

1.2. Identification de candidats par analyses d'expression différentielle

La construction des banques différentielles d'ADNc représente une approche possible pour l'identification de gènes candidats. Elle nécessite une bonne connaissance de l'organe et du stade physiologique auxquels le gène cible s'exprime et repose sur l'hypothèse que le phénotype provient bien d'une expression différentielle. Des banques d'ADNc sont généralement construites à partir de plantes présentant des phénotypes contrastés. On peut procéder par hybridation différentielle avec des échantillons d'ARN isolés de plantes présentant des différences de phénotype sur des filtres d'une banque d'ADNc de l'un des génotypes. Les clones positifs avec un échantillon et pas l'autre représentent des gènes candidats qui peuvent être recherchés dans la banque d'origine. Il est également possible d'utiliser des techniques d'hybridation soustractive de type SSH (Suppression Subtractive Hybridization) qui permettent d'isoler des séquences spécifiques d'un échantillon par rapport à un autre (DIATCHENKO *et al.* 1996; DIATCHENKO *et al.* 1999) sur la base de l'élimination de séquences communes entre les deux échantillons. Par cette technique, JIN et BIAN (2004) ont isolé l'ADNc PSG076 exprimé spécifiquement dans le pollen de blé mature ainsi que dans le pollen germé.

La technologie de puces à ADN permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment et dans un état donnés par rapport à un échantillon de référence. Cette technologie à haut débit est très prometteuse pour l'identification de gènes candidats différentiellement exprimés, et le suivi de l'expression des ARNm (GERHOLD *et al.* 1999; WANG *et al.* 1999). LAN *et al.* (2004) ont ainsi analysé les profils d'expression de gènes sur puce fabriquée à partir d'un grand nombre d'EST (73424) issues de pistils non pollinisés, de pistils 5h après pollinisation, de pistils 5 jours après pollinisation, de l'anthère, des feuilles, des racines, de l'embryon et de l'albumen pour identifier des gènes candidats impliqués dans la pollinisation et la fécondation chez le riz. Les résultats ont permis d'identifier 46 gènes différentiellement exprimés.

Cependant, ce type d'approche permet généralement l'identification de plusieurs dizaines de gènes candidats qui doivent ensuite être validés. Elle peut s'avérer selon l'espèce travaillée, assez lourde et peu efficace.

2. Clonage par mutagenèse insertionnelle

La stratégie dans ce cas repose sur l'identification de mutants pour le phénotype considéré dans une collection de plantes contenant des insertions qui conduisent à la perte de fonction du gène. Les éléments d'ADN capables de s'insérer aléatoirement dans les chromosomes, comme les transposons de type Mu ou AC/DS (MARTIENSSEN 1998) ou le T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* (AZPIROZLEECHAN and FELDMANN 1997), peuvent être utilisés pour créer cette perte de fonction. L'insertion d'un élément mobile dans un gène perturbe l'activité du gène au niveau transcriptionnel, au niveau de la traduction, ou les deux (BOUCHEZ and HOFTE 1998). Plusieurs populations de mutants ont été produites dans plusieurs espèces comme *Arabidopsis* (ALONSO *et al.* 2003; PARINOV and SUNDARESAN 2000), l'orge (TIEHAN *et al.* 2006) et le riz (CHERN *et al.* 2007; HIROCHIKA *et al.* 2004; TATIANA *et al.* 2004), soit avec des transposons hétérologues (principalement les transposons de maïs Ac/Ds (*Activator/Dissociation*) et En/Spm (*Enhancer/Suppressor-mutator*) soit avec le T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La séquence de l'élément inséré est connue, et ainsi le gène dans lequel il a été inséré peut être facilement récupéré en utilisant divers stratégies. Deux approches sont possibles : rechercher un mutant dans un gène candidat en utilisant des ressources publiques de banques de mutants pour lesquelles les séquences flanquants les insertions de l'élément (FST) ont été obtenues par technique de TAIL-PCR. De telles collections de séquences sont accessibles dans les bases de données pour le riz par exemple (au TIGR : http://rice.plantbiology.msu.edu/BACmapping/FST_map.shtml ou au CIRAD avec OrygenDB: <http://orygenesdb.cirad.fr/>). On peut également cribler une population de mutants par PCR en utilisant une paire d'amorces dont l'une est dessinée sur la séquence du gène candidat et l'autre sur la séquence de l'élément inséré. En l'absence de gène candidat il est aussi possible de cribler la collection de mutants pour le phénotype recherché et repérer a posteriori le gène qui contient l'élément inséré. Cependant, cette technique nécessite que le nombre d'insertions de l'élément soit faible pour corréler facilement le phénotype mutant à une insertion dans un gène unique. La saturation dépend de la taille du gène, de la taille et de l'organisation du génome de la plante utilisée et du nombre d'insertions dans la population (BOUCHEZ and HOFTE 1998). Des collections de mutants ont été phénotypées à large échelle pour un certain nombre de caractères et il devient maintenant possible de faire de telles recherches en partant des bases de données. C'est le cas chez le riz avec la base OryzaTag Line développé en France par le

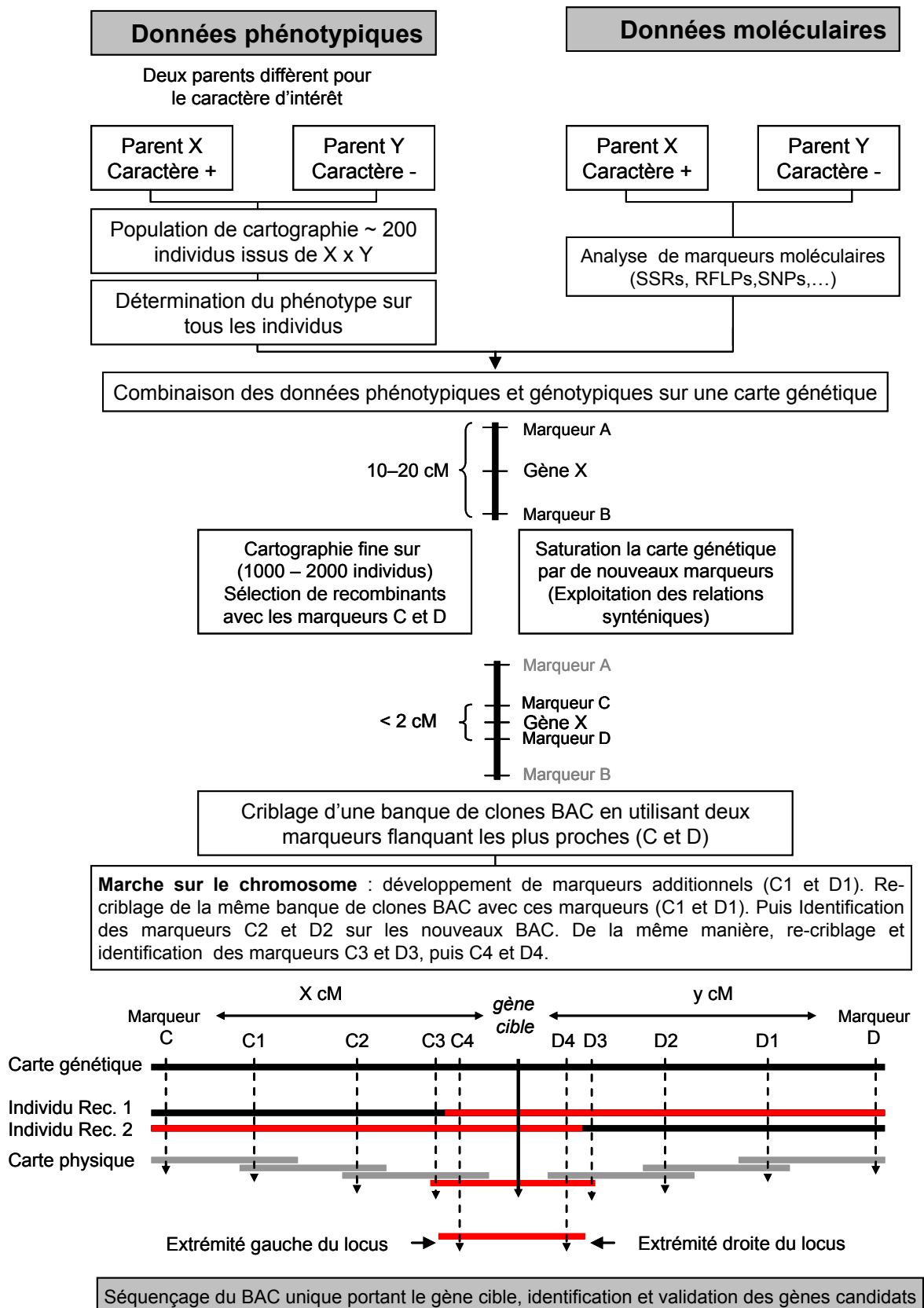


Figure 14 : Représentation schématique des différentes étapes d'un projet de clonage positionnel.

CIRAD et qui peut être consultée pour la recherche des mutants pour 7 classes de phénotypes, 18 organes et 2 stades de développement (<http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine/>).

Le principal avantage des approches fondées sur les transposons est leur facilité relative à générer de grandes populations d'insertions et leur capacité à utiliser la propension de nombreux éléments transposables à transposer vers des sites liés, ce qui permet de remobiliser les éléments à s'insérer à proximité du site d'insertion de départ et amplifier ainsi le nombre d'insertions. Il est plus difficile d'atteindre la saturation par mutagenèse insertionnelle avec des T-DNA. Il en résulte moins d'insertion (1-2 par lignée), mais les insertions sont stables, faciles à maintenir et ne présentent pas de fortes distorsions des sites d'insertions (AZPIROZLEECHAN and FELDMANN 1997). L'inclusion d'un gène dit rapporteur (résistance à un antibiotique ou produisant un substrat coloré) dans la séquence insérée permet de repérer les plantes transformées, mais peut aussi donner des informations sur le site d'insertion de l'ADN en fonction de l'expression observée de ce gène rapporteur (PEREIRA 2000). Les limites dues à l'inhibition de l'activité des éléments d'insertion dans des génomes hétérologues et au manque d'efficacité de transformation chez certaines espèces font que cette approche reste encore restreinte aux génomes modèles (*A. thaliana*, riz) ou aux génomes possédant des transposons actifs naturellement (e.g. maïs).

3. Le clonage positionnel

3.1. Principe

Le clonage positionnel consiste à identifier et isoler un gène d'intérêt à partir de la seule connaissance de sa localisation chromosomique sans aucune information *à priori* sur sa fonction potentielle. La disponibilité d'une population de cartographie génétique est le premier pré-requis pour débiter un programme de clonage positionnel. En bref, le principe (Figure 14) est d'établir une carte génétique approximative pour localiser le gène responsable du caractère d'intérêt dans un intervalle génétique de taille raisonnable (10-20 cM) sur un chromosome. Puis, une cartographie fine de la région par des marqueurs moléculaire proches et flanquant le gène d'intérêt est réalisée afin de réduire la distance génétique (1-2 cM) entre les deux marqueurs flanquant les plus proches. Cette étape est suivie par la construction d'une carte physique de la région à partir de clones génomiques de grande taille (BAC, YAC) ou YAC (Yeast Artificial Chromosome) chevauchant et couvrant la région. En l'absence de carte physique établie pour tout le génome, l'établissement de contigs physiques pour la région cible se fait par "marche sur le chromosome". Celle-ci consiste à développer de nouveaux

marqueurs à partir de la séquence (d'extrémité ou partielle) des BACs identifiés par les marqueurs précédents et à les cartographier génétiquement pour positionner le BAC par rapport au gène cible. Une fois la région couverte, un séquençage complet des clones BACs est réalisé afin d'identifier les gènes candidats présents dans l'intervalle et de les utiliser pour une validation fonctionnelle finale. Au delà des analyses génétiques et physiques, le point crucial d'un projet de clonage positionnel réside dans la capacité à phénotyper de façon reproductible et non ambiguë le caractère cible.

3.2. Les différentes étapes d'un clonage positionnel :

3.2.1. Cartographie approximative : position sur un bras chromosomique

3.2.1.1. Population initiale de cartographie

Un projet de clonage positionnel commence par le développement d'une population d'une petite taille qui permet la localisation rapide du gène d'intérêt sur un bras chromosomique. Généralement, les populations de cartographie initiale chez le blé comportent de 100 à 200 individus. Différents types de populations ont été classiquement utilisés, parmi lesquelles :

a. La population F₂ : Elle est issue de l'autofécondation d'un hybride F₁ entre deux parents présentant des phénotypes contrastés pour le caractère étudié. Ce type de population montre une ségrégation de type 1:2:1 (A/H/B, A, B : homozygotes parent A et B, H : hétérozygote) si le phénotype et les marqueurs sont de type co-dominant et une ségrégation de type 1:3 (allèle récessif : allèle dominant) pour les phénotypes et marqueurs de type dominant. La production de ce type de population est assez rapide mais la quantité de matériel végétal peut devenir rapidement limitant.

b. La Population "Single Seed Descent" ou descendance mono-graine (SSD) : Elle peut être dérivée par autofécondations successives d'individus F₂ pendant 5 à 6 générations (BRIM 1966). L'inconvénient de ce type de population est le temps nécessaire à sa mise en place (jusqu'à 6 générations d'autofécondation). L'avantage est que les individus sont finalement quasi isogéniques ce qui permet de caractériser plus facilement les traits dominants sur la totalité des individus et que la quantité de matériel végétal n'est plus limitante puisqu'il est possible de travailler sur des familles. De plus, de telles populations permettent l'analyse de plusieurs caractères d'intérêts simultanément dans différents environnements sur plusieurs années dans un programme de sélection et les lignées/variétés obtenues en F₆ portent une grande variabilité de combinaisons.

c. La population d'haploïdes doublés (HD) : Quand cela est faisable, l'obtention de lignées haploïdes doublées est le chemin le plus rapide pour obtenir des plantes homozygotes. Celles-ci peuvent être obtenues par culture d'anthères (androgenèse) d'individus F₁ ou par croisement avec du pollen d'une espèce apparentée génétiquement distante (gynogenèse): dans le cas du blé, par exemple, avec un croisement blé (*Triticum aestivum* L.) x maïs (*Zea mays* L.). La fécondation se fait normalement mais les chromosomes du pollinisateur sont éliminés de l'embryon hybride des stades précoces de développement (LAURIE and BENNETT 1987). Les embryons haploïdes sont ensuite exisés et cultivés *in vitro* pour obtenir des plantes haploïdes. Le doublement des chromosomes se fait spontanément (proportionnel) ou artificiellement en utilisant des agents chimiques comme la colchicine, et des lignées haploïdes doublées sont alors obtenues.

3.2.1.2. Marqueurs moléculaires

La cartographie génétique est basée sur l'utilisation de marqueurs dont la localisation relative au sein de groupes de liaisons (e.g. chromosomes) est déterminée par l'analyse de la fréquence de recombinaison entre ces marqueurs. Les marqueurs génétiques peuvent être de type biochimique, phénotypique ou moléculaire, ceux-ci étant depuis quelques années majoritairement utilisés car plus nombreux et plus facile à développer que les autres. Les marqueurs moléculaires que nous avons utilisés pendant les travaux de thèse sont les RFLP, SSR, SNP, EST, et les ISBP.

a. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Les marqueurs RFLP ou (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction) ont été utilisés pour la première fois en cartographie génétique humaine par BOTSTEIN *et al.* (1980). Cette technique repose sur le polymorphisme généré par des enzymes de restriction et la variabilité de taille des fragments d'ADN obtenus après digestion. L'ADN digéré est séparé par électrophorèse et transféré sur une membrane de nylon qui sera ensuite hybridée avec des sondes marquées (radioactivement le plus souvent) pour révéler les fragments d'ADN correspondants et le polymorphisme éventuel entre deux échantillons. Les RFLP ont été très utilisés dans les années 90 pour établir les premières cartes génétiques chez le blé (CHAO *et al.* 1989; KAMMORGAN *et al.* 1989; ANDERSON *et al.* 1992) et initier les études de colinéarité entre les espèces de graminées (MOORE *et al.* 1995a; DEVOS *et al.* 1992; VAN DEYNZE *et al.* 1998).

b. EST (Expressed Sequence Tag)

Les Expressed Sequence Tags (ESTs) sont de petites séquences d'ADN (généralement de 300 à 500 nucléotides de longueur) qui sont générées par séquençage de l'une et l'autre des extrémités d'un gène exprimé (ADNc). Les bases de données publiques contiennent actuellement 1,066,997 entrées (Juillet 2009) pour le blé tendre *Triticum aestivum* L. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) ce qui en fait l'une des espèces végétales les plus riches en EST. Les EST constituent une source remarquable de données pour l'identification de gènes et le développement de marqueurs moléculaires, qui permettent ensuite d'établir des cartes génétiques fonctionnelles utiles dans l'identification de régions génomiques contrôlant des caractères d'intérêt. Les EST étant constituées de séquences codantes, elles sont relativement bien conservées entre les différentes espèces apparentant à la même famille et sont donc largement utilisées dans les analyses de génomiques comparées. Chez le blé tendre, cependant leur cartographie est longue et laborieuse car elle nécessite la mise en place de techniques permettant de distinguer les copies homéologues issues des génomes A, B et D.

c. SSR (Simple Sequence Repeat)

Les génomes des Eucaryotes contiennent de nombreuses séquences contenant des motifs répétés courts de 1 à 6 nucléotides appelés microsatellites ou single sequence repeats (SSRs) (HAMADA *et al.* 1982; TAUTZ and RENZ 1984; SCHAFER *et al.* 1986; BRAATEN *et al.* 1988; LITT and LUTY 1989; VERGNAUD 1989). Les SSR peuvent être amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant une paire d'amorces flanquant le motif. Ces régions montrent un fort polymorphisme dû à la variation en longueur des motifs répétés qui serait due à un phénomène de glissement de répétitions lors de la réplication de l'ADN (LEVINSON and GUTMAN 1987). Les fragments PCR sont séparés par électrophorèse et une différence de la taille du microsatellite amplifié se traduit directement par une variation de la distance de migration. Les marqueurs SSR généralement très polymorphes sont utiles pour l'intégration des cartes génétiques et physiques dans les espèces végétales, et ont simultanément fourni les sélectionneurs et les généticiens un outil efficace pour lier les variations phénotypiques et génotypiques (GUPTA and VARSHNEY 2000).

Les chances de détecter du polymorphisme entre les génotypes varient selon plusieurs facteurs. THUILLET *et al.* (2004) ont montré en testant 99 marqueurs SSR sur 7 lignées de blé tendre que le taux de polymorphisme est lié à la longueur des allèles, la nature des motifs (CA

versus CT), la structure des locus (parfait ou imparfait) et la position sur le chromosome. Les microsatellites chez le blé hexaploïde sont plus variables quand les allèles ségrégeant sont parfaits et composés d'un grand nombre de répétitions. Les locus localisés dans les régions distales des chromosomes, qui présentent des niveaux de recombinaison élevés, ont une taille d'allèle plus longue et sont plus polymorphes que ceux des régions proximales. Les microsatellites du génome D du blé tendre sont significativement plus courts que ceux des génomes A et B mais ces différences en longueur n'affectent pas les taux de polymorphisme entre les trois génomes A, B et D (THUILLET *et al.* 2004). Leur simplicité d'utilisation, leur fort taux de polymorphisme et leur capacité d'analyse à moyen débit ont permis aux microsatellites (SSRs) de remplacer progressivement les marqueurs RFLP en génétique du blé.

Les marqueurs microsatellites peuvent provenir soit d'ADN génomique (gSSR) soit de séquences géniques telles que les EST (EST-SSR). La disponibilité d'un grand nombre de séquences d'EST et d'outils bioinformatiques a facilité le développement des marqueurs microsatellites dérivés des EST chez les céréales (VARSHNEY *et al.* 2005; ZHANG *et al.* 2005).

d. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Les SNP sont des variations naturelles qui ne concernent qu'un seul nucléotide dans une séquence donnée. Comparés aux autres marqueurs moléculaires, les SNP présentent l'avantage d'une répartition homogène dans tout le génome et d'être excessivement nombreux. Ce nombre élevé permet donc potentiellement la création de cartes génétiques à très haute densité (*cf.* projet du génome humain avec plusieurs millions de SNP et la création des cartes Hapmap). L'accumulation récente des données de génomes complètement séquencés, de séquences génomiques ainsi que de séquences codantes (EST) a permis de développer des marqueurs SNP chez plusieurs génomes végétaux comme le maïs (GORE *et al.* 2009), l'orge (KOTA *et al.* 2008) le tournesol (LAI *et al.* 2005), le riz (FELTUS *et al.* 2004) et le blé (SOMERS *et al.* 2003). Ils ont jusqu'à présent généralement été détectés en tant que marqueurs dominants et utilisés pour la construction des cartes génétiques et physiques ainsi que pour étudier la phylogénie, la diversité génétique et le déséquilibre de liaison (LD) (PAUX and SOURDILLE 2009). Après le développement de nouvelles technologies telles que la PCR spécifique d'allèle, le SNaPshot, et le SNPlex (Applied Biosystems), il est devenu possible de détecter les 2 allèles et d'avoir des marqueurs SNP co-dominants. De plus, le développement de technologies de génotypage à haut débit telle que la plateforme Illumina peut analyser de 96 jusqu'à 2 millions de SNP dans un seul essai (revue par PAUX and SOURDILLE, 2009).

e. ISBP (Insertion Site–Based Polymorphism)

Les éléments transposables ETs (JAMPATES and DVORAK 1986) sont répandus dans les génomes de toutes les plantes. Ils sont omniprésents, répartis uniformément, et montrent un polymorphisme insertionnel dans et entre les espèces (KUMAR *et al.* 1997; PAUX *et al.* 2006). Ces propriétés ont récemment permis le développement de plusieurs types de marqueurs moléculaires tels que les S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism; WAUGH *et al.* 1997), I-RAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism; KALENDAR *et al.* 1999) et REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism, KALENDAR *et al.* 1999) et RBIP (Retrotransposon-Based Insertional Polymorphism; FLAVELL *et al.* 1998). Ces marqueurs moléculaires ont été utilisés avec succès pour établir des phylogénies, étudier la biodiversité et générer des cartes de liaison pour des caractères agronomiques importants dans plusieurs espèces, comme l'orge, le pois, le riz et le tabac (KALENDAR *et al.* 1999; KENWARD *et al.* 1999; SCHULMAN *et al.* 2004).

Chez le blé, les ETs représentent plus de 70% du génome (LI *et al.* 2004; PAUX *et al.* 2006) et jouent un rôle majeur dans la structure et l'évolution de son génome. Récemment, notre laboratoire a développé un nouveau type de marqueur (ISBP, *Insertion Site–Based Polymorphism*) basé sur le polymorphisme d'insertion des ET. Les marqueurs ISBP sont basés sur l'amplification par PCR d'un fragment contenant la jonction entre un élément transposable et une séquence génomique flanquante (PAUX *et al.* 2006). Ces marqueurs sont remarquablement spécifiques d'un locus donné (67%), et se sont révélés hautement polymorphes (53%) dans un test effectué entre 5 variétés de blé tendre (PAUX *et al.* 2006). Ceci a été confirmé récemment sur un grand nombre de variétés de blé issues des programmes de sélection (E. Paux, Comm. Pers.) Le polymorphisme provient d'une différence entre sites d'insertions et peut se traduire par des polymorphismes de taille ou, le plus souvent, par des allèles nuls. Les ISBP comportent également de très nombreux SNP ce qui en fait une source intéressante de ce type de marqueur pour le haut débit.

La limite principale de cette technique est le besoin de produire une séquence dans laquelle l'insertion d'ET peut être identifiée. Cependant, puisque les marqueurs ISBPs peuvent être identifiés à partir de séquences génomiques courtes (ex. séquences d'extrémités des BAC, BES) qui sont de plus en plus disponibles dans les bases de données, ils représentent une très bonne source de nouveaux marqueurs pour la cartographie génétique et physique chez les *Triticeae* (PAUX *et al.* 2008).

3.2.1.3. *Cartographie génétique*

La carte génétique détermine la position relative des marqueurs sur les chromosomes par analyse de ségrégation de ces marqueurs. Les distances génétiques qui séparent les marqueurs sont exprimées en centimorgan (cM) ; 1cM correspond à la distance sur laquelle 1% des chromosomes ont recombiné. Cette conversion est réalisée avec une fonction de cartographie. Parmi les nombreuses fonctions proposées, la fonction de Haldane (HALDANE 1919) et la fonction de Kosambi (KOSAMBI 1944) sont les plus connues. La fonction de Haldane est basée sur l'hypothèse de la non-interférence entre les crossovers. La fonction de Kosambi tient compte de l'interférence et ajuste la distance génétique basée sur les interférences qui modifient la proportion de doubles crossovers. L'analyse de liaison sur de grands effectifs tels que ceux utilisés en cartographie génétique est réalisée à l'aide de programmes informatiques. L'un des plus courants est MapMaker (LANDER *et al.* 1987). La liaison génétique entre deux locus est testée par un test de maximum de vraisemblance en fonction d'un score LOD minimum et de taux maximum de recombinaison admis. Les fonctions de Haldane et de Kosambi sont disponibles dans le programme et permettent de déterminer la distance génétique en fonction de taux de recombinaison. Le programme utilise un algorithme efficace qui permet l'analyse simultanée en multipoint d'un grand nombre de locus. Il comprend également un langage de commande interactif qui permet à un généticien d'explorer les données d'analyse de liaison. Après analyse statistique, le programme trace des cartes génétiques des chromosomes.

3.2.2. *Cartographie fine : position sur la carte physique*

Quand la localisation approximative du locus est établie, il est nécessaire de développer une population de cartographie fine plus large dans laquelle les recombinants seront recherchés entre deux marqueurs flanquant le gène à isoler. Cette approche permet de positionner plus précisément le gène cible tout en réduisant le nombre d'individus à analyser. La probabilité d'un cross over diminue avec la distance physique entre les marqueurs. Par conséquent, une cartographie fine nécessite de travailler sur des populations de plusieurs centaines voire des milliers d'individus afin d'identifier un nombre de recombinaisons suffisant dans la région du gène cible.

Tableau 3 : Probabilité d’obtenir l’intervalle cible <100 kb pour diverses tailles d’échantillon. La colonne du milieu a été incluse pour prendre en compte le fait que la réponse ne dépend que de variables à travers le ratio $NT/(100R)$. D’après (DURRETT *et al.* 2002). (N): le nombre de gamètes dans l’échantillon, (R) : le ratio kb/cM (kilobase/centimorgan) pour la région génomique en question.

N	$NT/(100R)$	P
200	0.8	0.1912
400	1.6	0.4751
600	2.4	0.6916
800	3.2	0.8288
1000	4.0	0.9084
1200	4.8	0.9523
1400	5.6	0.9756
1600	6.4	0.9877
1800	7.2	0.9939

Idéalement, l'isolement d'un gène cible se termine une fois que des marqueurs moléculaires co-ségrégent complètement avec le gène cible dans un intervalle physique réduit. La fréquence de recombinaison méiotique autour du locus cible (définie comme R = kilobase/ cM), ramenée au nombre de marqueurs peut être utilisée pour déterminer la taille idéale de la population de cartographie fine. DURRETT *et al.* (2002) ont établi une formule de calcul simple pour estimer le nombre d'événements méiotiques nécessaires pour encadrer un gène cible pour un intervalle physique de taille donnée (en kilobase). Ces calculs supposent que l'on peut observer les crossovers dans les gamètes provenant d'un hybride F_1 , qui sont hétérozygotes pour le locus cible, que le génotype du locus cible peut être déterminé sans ambiguïté, et que les taux de recombinaison peuvent être considérés constants près de ce locus.

L'estimation est basée sur la formule suivante :

$$P = 1 - (1 + NT/(100R))e^{-NT/(100R)}$$

Où:

T = la distance (en kilobases) entre deux crossovers autour du gène cible.

R = le ratio kb/cM (kilobase/centimorgan) pour la région génomique en question.

N = le nombre de gamètes dans l'échantillon (N est équivalent à deux fois le nombre de descendants F_2).

P = la probabilité de trouver dans N gamètes un minimum de deux crossovers (un de chaque côté du gène cible), à une distance $< T$.

Cette formule suppose que le ratio kilobase/centimorgan (R) soit constant dans une région d'une largeur ($2T$) centrée au gène cible. Le tableau 3 indique le nombre de gamètes à tester pour différentes probabilités de réduire l'intervalle cible à < 100 kb.

Selon DINKA *et al.* (2007), ce modèle surestime souvent le nombre d'individus à génotyper car seule la fréquence de recombinaison à l'échelle du génome est employée plutôt que les taux de recombinaison locaux. DINKA *et al.* (2007) se sont appuyés sur les travaux de DURRETT *et al.* (2002), pour développer de nouvelles formules en tenant en compte d'une faible densité en marqueurs moléculaires disponibles dans l'intervalle cible (provoquant des crossovers à manquer), et de taux de recombinaison locaux (R) hauts ou faibles par rapport à la moyenne à l'échelle du génome. Ces estimations peuvent être utiles dans les phases finales d'un projet lorsqu'il faut décider d'un effectif de plantes à analyser pour obtenir suffisamment de recombinaison et réduire le plus possible les intervalles physiques et les gènes candidats au locus cible.

3.2.3. Construction d'un contig physique au locus cible

Le positionnement de la carte physique sur la carte génétique se fait par l'intermédiaire des marqueurs moléculaires issus de la carte génétique qui sont ancrés sur un ensemble de clones BAC ou YAC chevauchant et couvrant la région du gène d'intérêt (Figure 14).

La carte physique peut être facilement établie si le génome de l'espèce étudiée a été complètement séquencé sur la base d'une approche BAC par BAC établie au travers d'une carte physique du génome comme dans le cas du riz (GOFF *et al.* 2002; YU *et al.* 2002). Les bases de données publiques (ex. <http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>) permettent l'identification rapide de l'ensemble des clones BAC couvrant une région cible et le développement de marqueurs moléculaires est facilité en raison de la disponibilité de la séquence. L'utilisation des marqueurs sur une population de cartographie fine conduit à la détection des événements de recombinaison autour du gène d'intérêt avec une distance physique réduite entre les deux marqueurs encadrant le gène cible ce qui permet d'identifier directement un minimum de gènes candidats.

La tâche est bien plus difficile quand le génome de l'espèce étudiée n'est pas séquencé, comme c'est le cas du blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$, ABD). Le séquençage du génome du blé tendre a été initié (IWGSC, International Wheat Genome Sequencing Consortium, <http://www.wheatgenome.org/>) avec la construction de la carte physique du génome au travers d'une approche chromosome par chromosome. L'exemple le plus avancé actuellement de la construction de la carte physique d'un chromosome de blé est celui mené au sein de notre laboratoire sur le chromosome 3B. Récemment, une carte physique ancrée de ce chromosome de 1Gb a été réalisée à partir d'une banque de clones BAC spécifique (PAUX *et al.* 2008). 82% du chromosome 3B ont été assemblés en 1036 contigs qui ont été ancrés par 1443 marqueurs moléculaires sur des cartes génétiques. Les projets de clonage positionnel sur ce chromosome sont désormais grandement facilités avec la disponibilité de la carte physique (http://urgi.versailles.inra.fr/gbrowse/cgi-bin/gbrowse/Wheat_FPC/).

Les cartes des 20 autres chromosomes sont en cours (<http://www.wheatgenome.org/>) mais pas encore disponibles et une marche sur le chromosome reste nécessaire pour le clonage des gènes localisés ailleurs que sur le chromosome 3B. La marche sur le chromosome commence à partir des deux marqueurs cartographiés génétiquement les plus proches de part et d'autre du gène cible (marqueurs C, D en Figure 14). Ces marqueurs sont utilisés pour cribler une banque génomique de type banque BAC afin d'établir une première étape de la carte physique (Figure 14). De nouveaux marqueurs (C1, D1, Figure 14) sont ensuite

identifiés à partir de ces clones BAC soit à partir de séquence d'extrémités de BAC ou de séquençage partiel des clones (Shotgun). La cartographie de ces nouveaux marqueurs doit permettre de réduire la distance génétique pour se rapprocher du gène cible (Figure 14). Différents cycles de criblage de la banque BAC avec des marqueurs de proche en proche peuvent ainsi être effectués (C2, C3, D2, D3, Figure 14) jusqu'à ce qu'aucun événement de recombinaison ne soit plus détectable dans la population. Si la taille de la population de cartographie est adaptée, l'arrivée au point 0 de recombinaison doit permettre d'identifier un seul clone BAC portant le(s) gène(s) cible (C4, D4, Figure 14).

3.2.4. Identification du gène et validation

Une fois le fragment chromosomique portant le gène d'intérêt identifié, le séquençage complet du fragment chromosomique (ex. clone BAC) donne accès à un certain nombre de gènes candidats. Il faut noter ici que les banques BAC ne sont pas toujours issues des génotypes d'intérêt pour le projet et il arrive que la carte physique soit réalisée dans un génotype ne portant pas le gène cible. Dans ce cas, il est nécessaire d'avoir accès à une banque spécifique du génotype d'intérêt qui peut être une banque BAC non organisée en clones individuels pour réduire les coûts (ISIDORE *et al.* 2005a) ou une banque de plus petits inserts (fosmides, cosmides), de façon à ce qu'un seul criblage soit nécessaire pour isoler la région d'intérêt.

Les gènes candidats doivent ensuite être validés par différentes approches qui peuvent dépendre des ressources disponibles dans l'espèce étudiée. Chez le blé, la transgénèse (par biolistique ou par *Agrobacterium tumefaciens*) est maîtrisée en routine dans de nombreux laboratoires et des populations de mutants sont également disponibles pour le blé tendre et des blés diploïdes.

V. Utilisation de la colinéarité entre céréales pour accélérer la cartographie chez le blé

1. Définitions

1.1. Orthologie et Paralogie

L'orthologie et la paralogie ont été définis par FITCH (1970) pour distinguer l'origine de deux types de séquences homologues. L'*orthologie* décrit des gènes de différentes espèces qui dérivent d'un ancêtre commun. Les gènes *orthologues* peuvent ou ne peuvent pas avoir la

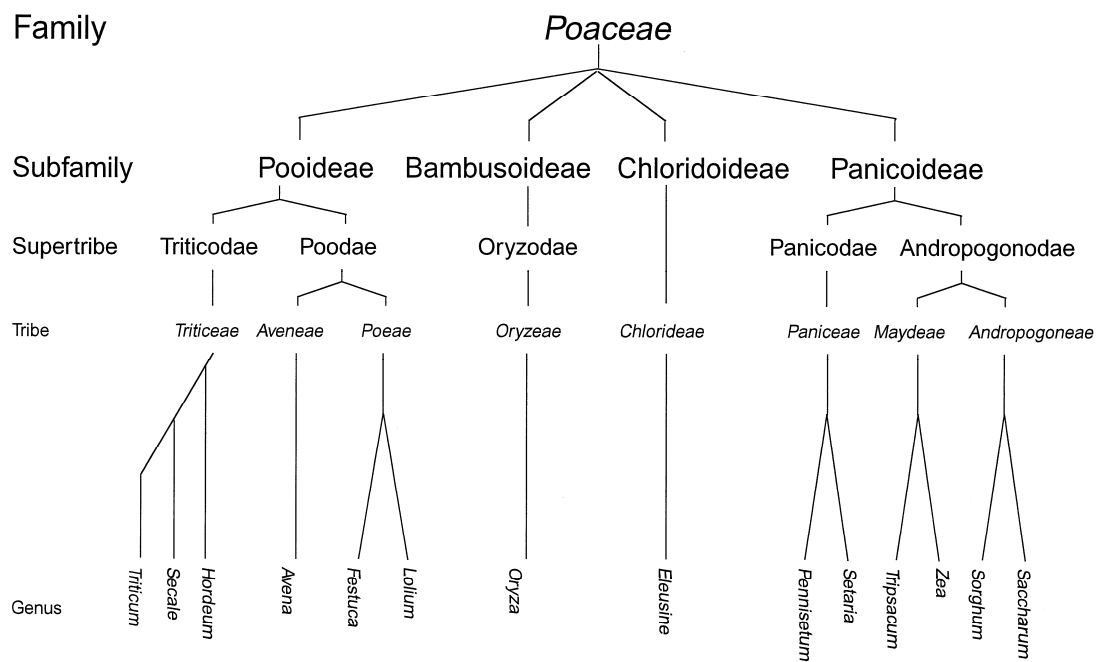


Figure 15 : Relations taxonomiques dans la famille des Poacées. D'après DEVOS and GALE (1997).

même fonction. La *paralogie* décrit des gènes homologues au sein d'une même espèce et qui ont divergé par duplication.

1.2. Synténie et colinéarité

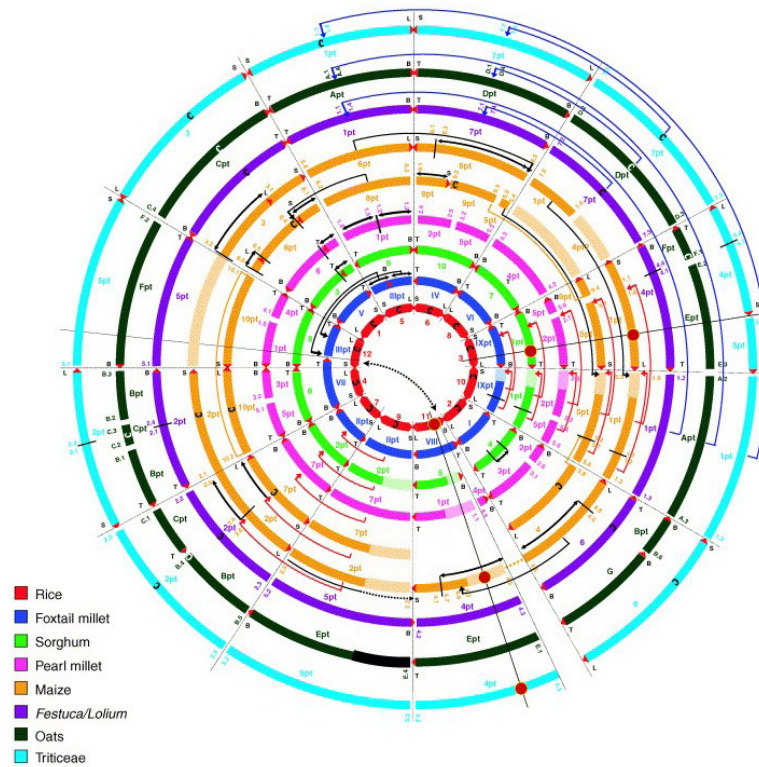
Le terme "*synténie*" est originaire du terme grec (syn = ensemble, taenia = ruban) et a été utilisé en génétique pour indiquer la présence de deux ou plusieurs locus sur le même chromosome. À l'époque de la pré-génomique le terme était employé pour parler de régions situées sur un même chromosome, indépendamment du fait qu'elles soient génétiquement liées (RENWICK 1971). Aujourd'hui, la définition a évolué et est souvent utilisé pour désigner les locus de différents organismes situés sur une région chromosomique provenant d'un ancêtre commun.

Il est plus exact cependant de parler de colinéarité pour décrire ce type de conservation. Deux définitions de la « *colinéarité* » peuvent être trouvées : Une définition "stricte" qui considère que deux ou plusieurs locus partagés entre des génomes sont colinéaires si les locus se trouvent sur le même groupe de liaison au sein de chaque espèce et si l'ordre des locus est le même dans les deux espèces. La seconde définition plus "générale" proposée par GAUT (2001) dans laquelle les segments colinéaires sont définis comme une série de marqueurs sur un chromosome (ou groupe de liaison) et qui se trouve dans la même orientation commune sur un deuxième chromosome (ou groupe de liaison). Ici, l'ordre des locus est globalement conservé mais il peut subsister quelques inversion de gènes entre le premier et le second chromosome.

2. Génomique comparée chez les céréales

La génomique comparée entre espèces de la famille des *Poaceae* (Figure 15) et plus particulièrement les céréales, comme l'orge, le blé, le maïs, le riz et le sorgho, a été largement étudiée dans la dernière décennie. Les premières études ont montré un bon niveau de la conservation dans l'ordre des marqueurs (macro-colinéarité) et ont amené à promouvoir le riz comme espèce modèle pour les autres céréales. La publication de la première séquence du génome de riz et le développement de ressources génomiques (collection d'ESTs, banques BAC) pour différentes espèces de céréales a permis ensuite de réaliser des comparaisons plus fines (micro-colinéarité) (SALSE and FEUILLET 2007).

A)



B)

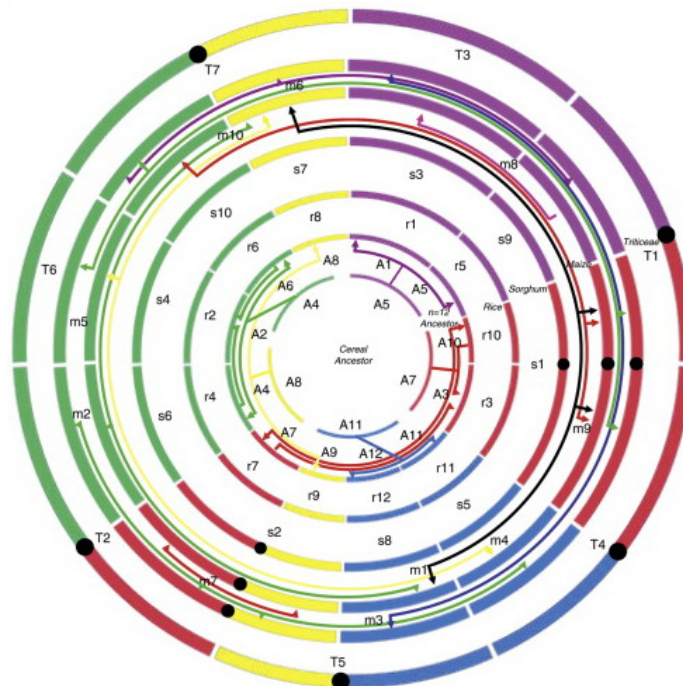


Figure 16 : Diagrammes des cercles concentriques des génomes des céréales. A) Représentation de (DEVOS 2005).montrant les relations connues entre les génomes de huit espèces appartenant à trois différentes sous-familles dans la famille des graminées. Chaque cercle représente un génome, les triangles rouges indiquent les télomères, le centromère est indiqué par un C. Les flèches noires indiquent des réarrangements par rapport au riz, les flèches rouges et bleues des réarrangements communs dans les sous-familles des Panicoideae et des Pooideae, respectivement. (B) Représentation de (BOLOT *et al.* 2009) indiquant les relations ancestrales entre les génomes de 4 espèces de graminées et les 5 chromosomes de leur ancêtre commun. Les couleurs des chromosomes se rapportent aux couleurs des 5 chromosomes ancestraux.

2.1. Analyses de macro-colinéarité

La macro-colinéarité se réfère à des analyses réalisées généralement au niveau des cartes génétiques. Les premières analyses comparées de cartographie de marqueurs RFLP ont révélé une conservation importante du contenu et de l'ordre des locus malgré des millions d'années de divergence entre les génomes des Poacées. Elles ont amené les chercheurs du groupe de M. Gale (JIC, UK) à proposer une représentation comparée des cartes génétiques en cercle concentriques qui permet d'aligner les génomes du riz (*Oryza sativa* L.), du maïs (*Zea mays* ssp. *mays* L.), du sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench), de la canne à sucre (*Saccharum* sp.), du millet (*Setaria italica* L. Beauv.) et des espèce de la tribu des *Triticeae*: blé (*Triticum*), orge (*Hordeum*) et seigle (*Secale*) (MOORE *et al.* 1995a; GALE and DEVOS 1998; DEVOS and GALE 2000; FEUILLET and KELLER 2002). Certains réarrangements ont été détectés mais globalement le taux de conservation semblait remarquable.

Le niveau de résolution des analyses a augmenté avec l'accroissement du nombre de marqueurs disponibles (e.g. grands programmes de développement d'EST chez les *Triticeae* et assignation physique de milliers d'EST dans les bins de délétions du blé), l'intégration de nouvelles cartes génétiques et de nouveaux génomes (fétuque) et le séquençage complet du génome du riz (GOFF *et al.* 2002; SEQUENCING PROJECT INTERNATIONAL RICE GENOME 2005; YU *et al.* 2002). La résolution croissante de ces analyses a révélé d'autres réarrangements chromosomiques dans les blocs de liaison ancestraux et a finalement conduit à la révision de la représentation des cercles concentriques des céréales (DEVOS 2005, Figure 16A). Très récemment des études de paléogénomique (BOLOT *et al.* 2009) réalisées dans le groupe (J. Salse) ont permis de définir un ancêtre commun aux génomes des céréales comprenant 5 chromosomes et une nouvelle représentation des cercles a pu être réalisée en tenant compte de ces relations ancestrales (Figure 16B).

2.2. Analyses de micro-colinéarité

L'observation croissante au cours de projets de clonage positionnels (KILIAN *et al.* 1995; KELLER and FEUILLET 2000) que les réarrangements pouvaient limiter dans certains cas l'exploitation directe de la colinéarité entre le riz et les autres céréales a amené les généticiens à développer des ressources génomiques directement à partir des génomes d'intérêt. Plusieurs banques de clones BAC ont ainsi été construites à cette période chez l'orge et le blé, soit à partir de génomes entiers soit à partir de chromosomes ou de bras chromosomiques individuels (revu par SALSE and FEUILLET, 2007). Le séquençage de BACs et la comparaison

dans régions orthologues ont permis d'observer des données plus précises sur le degré de conservation entre genres de graminées. Ils se sont faits à différents niveaux de comparaison.

2.2.1. Microcolinéarité interspécifique chez les céréales

L'une des premières études de micro-colinéarité réalisés chez les céréales a concerné le locus *sh2/a1* (*Shrunken 2/ Anthocyaninless1*) entre le maïs, le sorgho et le riz (CHEN *et al.* 1997; CHEN *et al.* 1998). L'analyse comparée de séquences de BAC orthologues montrée que malgré une large différence dans la longueur des régions inter-géniques chez le maïs en comparaison du riz et du sorgho et malgré une duplication en tandem d'un gène (*A1*) chez le sorgho, l'ordre linéaire pour quatre gènes (*Sh2*, *X1*, *X2* et *A1*) présents à ce locus était remarquablement conservé entre les trois espèces. Par contre, chez les *Triticeae*, la colinéarité était limitée à la conservation des gènes *Sh2* et *X1* sur le chromosome 1L, tandis que les deux autres gènes *X2* et *A1* étaient localisés sur un chromosome non orthologue (3L) démontrant ainsi que de nombreux réarrangements, incluant une translocation de gènes, ont affecté ce locus depuis la divergence entre les *Triticeae* et les autres *Poaceae* (LI and GILL 2002). De manière similaire, des réarrangements substantiels ont été observés au locus *adh1* chez le maïs, riz et sorgho. Neuf gènes ont été trouvés en ordre colinéaire entre maïs et sorgho mais trois autres gènes additionnels étaient présents dans un intervalle 3 fois plus large chez le maïs (TIKHONOV *et al.* 1999). La comparaison avec le riz a montré une histoire complexe de réarrangements impliquant des translocations de gènes, des insertions et délétions conduisant les auteurs à proposer que le génome du riz soit plus stable que celui du maïs qui aurait subi des délétions de gènes à haute fréquence pendant son évolution (TARCHINI *et al.* 2000; BENNETZEN and RAMAKRISHNA 2002; ILIC *et al.* 2003). D'autres études de micro-colinéarité réalisées sur d'autres locus orthologues portant des gènes impliqués dans la résistance aux maladies (e.g. *Lrk*, *Rp1* et *Rph7*), le développement (e.g. *Vrna1*, *lg2/lrs1*, *phdH1*) et la qualité (e.g. *Zein*, *Ha*, *r/b*, *Glutenin*) ont toutes confirmé un niveau de réarrangements généralement assez important (revu en SALSE and FEUILLET (2007)) qui a amené à l'idée que la colinéarité entre le riz et les autres espèces était d'environ 50% (GAUT 2002) et que le niveau de conservation pouvait varier de façon importante en fonction du type de locus et de la localisation sur les chromosomes.

2.2.2. Microcolinéarité intra-spécifique (entre différents génomes de blé)

Les études de micro-colinéarité intra-spécifique, à l'intérieur des espèces qui ont divergé depuis moins de 5 millions d'années comme ceux qui composent les blés polyploïdes, ont pu être réalisées grâce à la construction des banques de clones BAC à partir d'espèces à différents niveaux de polyploïdie. Ainsi, plusieurs études ont comparé des séquences de BAC issues des génomes homéologues A, B et D du blé qui ont divergé d'un ancêtre commun il ya environ 2,5 à 4,5 millions d'année (HUANG *et al.* 2002). Les deux premières études ont comparé les régions orthologues correspondantes au gène de gluténine dans les génomes A et B de *T. durum* et D d'*Ae. tauschii* (GU *et al.* 2004) ainsi que le génome A de *T. durum* et *T. monococcum* (WICKER *et al.* 2003). Ces études ont montré que la conservation entre les différents génomes était souvent limitée aux gènes, alors que les régions inter-géniques étaient totalement différentes principalement en lien avec l'insertion d'éléments transposables et à la suite d'événements de recombinaison illégitimes.

La conservation de la micro-colinéarité entre le génome A de *T. monococcum* et de *T. aestivum* a été exploitée pour réaliser la marche sur le chromosome qui a finalement conduit au clonage du gène pour la résistance à la rouille des feuilles (*Lr10*) chez le blé hexaploïde (STEIN *et al.* 2000). Puis la micro-colinéarité intra-spécifique a été étudiée plus finement en comparant trois régions orthologues de *T. monococcum*, *T. durum* et *T. aestivum* (ISIDORE *et al.* 2005b). Là encore, des insertions ainsi que des délétions et des crossovers entre éléments transposables ont réduit le pourcentage global de conservation de séquence (33% seulement) entre les trois régions orthologues, et peu d'éléments étaient conservés dans les régions inter-géniques. Des réarrangements impliquant des délétions suivies par une grande inversion ont été observés chez le blé hexaploïde. Par contre, une bonne conservation dans l'ordre et le contenu en gènes a été trouvé entre la séquence des blés diploïdes et tétraploïdes.

Finalement, un séquençage comparatif au niveau du locus *Ha* (Hardness locus) impliqué dans la dureté des grains chez le blé a été réalisé en comparant les BAC orthologues de *T. aestivum*, *T. durum*, et ses progéniteurs diploïdes *T. monococcum* et *Ae. tauschii* (CHANTRET *et al.* 2005; CHANTRET *et al.* 2008). Des réarrangements, tels que l'insertion d'éléments transposables, des délétions de séquences, des duplications et des inversions impliquant des événements de recombinaisons illégitimes, ont été détectés comme étant responsables de différences majeures observées entre le même génome à différents niveaux de polyploïdie.

2.2.3. Comparaisons inter-variétales

L'absence de colinéarité inter-génique observée au niveau intra-spécifique entre les espèces ayant récemment divergé amène à poser la question des réarrangements de séquences entre lignées et variétés d'une même espèce. La première a concerné la comparaison de séquences de BAC de maïs portant le gène *bz1* (Bronze-1) dans deux lignées (McC et B73). Elle a révélé de manière surprenante des différences étonnantes entre les deux lignées. Celles-ci ont été non seulement observées au niveau de la longueur et la composition des séquences inter-géniques, mais également dans le contenu et la densité des gènes, et à des niveaux équivalents aux différences observées entre deux espèces différentes (FU and DOONER 2002). Des variations similaires ont été observées ensuite à d'autres locus orthologues de maïs tels que le cluster de gènes *z1C-1* (zein protein storage cluster) entre les lignées hybrides B73 et BSSS53 (SONG and MESSING 2003) et quatre autres régions chromosomiques alléliques chez les lignées M17 et B73. Chez l'orge, plus de 300 kb d'une séquence contenant le gène de la résistance à la rouille des feuilles (*Rph7*) ont été comparés entre deux variétés (SCHERRER *et al.* 2005). La colinéarité était limitée à 5 régions géniques et deux régions inter-géniques représentant moins de 35% de la séquence totale. L'analyse basée sur la PCR pour les régions inter-géniques a montré une divergence récente et rapide au locus homologues dans le génome de l'orge cultivé. Finalement, les réarrangements observés chez l'orge et le riz étaient moins dramatiques que ceux observés chez le maïs, ce qui renforce l'idée que le maïs possède un génome hautement instable en comparaison des autres génomes des *Poaceae*.

VI. Objectifs de la thèse

L'objectif du projet de thèse était de développer des marqueurs pour la sélection et d'isoler le gène *SKr* par clonage positionnel afin de mieux comprendre les bases moléculaires de l'aptitude ou de l'inaptitude au croisement du blé avec le seigle. Le clonage de ce gène majeur d'aptitude au croisement chez le blé représenterait une avancée fondamentale dans la compréhension d'un phénomène essentiel chez les plantes de grandes cultures et pourrait avoir des applications importantes dans la capacité des sélectionneurs à augmenter la base génétique des pools élites du blé. En effet, le gène et/ou les marqueurs développés au cours des étapes de clonage faciliteraient grandement l'introduction de l'allèle croisable *skrskr* dans un plus grand nombre de variétés de blé soit par transgénèse soit par sélection assistée par marqueurs (SAM).

Les premières étapes du projet (Chapitre 2) ont consisté à vérifier les données phénotypiques (classes d'aptitude au croisement avec le seigle) et génotypiques (pour deux marqueurs ayant servi à sélectionner des recombinants) d'une population recombinante SSD F_6 qui nous avait été transmise d'une étude précédente (LAMOUREUX *et al.* 2002). L'analyse statistique des données phénotypiques et génotypiques validées devait permettre de déterminer si *SKr* se comportait comme un gène majeur dans la population MP98 x Ct et s'il pouvait être traité comme un caractère mendélien. L'un des points essentiels était de vérifier la localisation du gène relativement aux deux marqueurs utilisés pour sélectionner les recombinants dans l'étude précédente afin d'avoir une base solide pour augmenter la densité de la carte génétique au locus *SKr*.

La deuxième partie des travaux (Chapitre 3) visait à exploiter les relations synténiques avec les espèces de graminées voisines, le riz et l'orge, afin d'identifier les régions synténiques du locus cible *SKr* et ainsi continuer à densifier la région par de nouveaux marqueurs moléculaires. Les marqueurs cartographiés les plus proches de *SKr* devaient permettre d'initier la construction de la carte physique au locus *SKr* par criblage d'une banque BAC, réaliser du séquençage et développer d'autres marqueurs pour réduire le plus possible l'intervalle génétique entre des gènes.

Dans la troisième partie du travail (Chapitre 4), l'objectif était de développer de nouvelles populations de cartographie fine nécessaires à la localisation précise du locus *SKr* sur les cartes génétiques et physiques.

Enfin, dans une dernière étape (Chapitre 5), les marqueurs les plus proches du gène développés au cours des travaux de thèse devaient être testés pour leur utilité dans les

programmes de sélection assistée par marqueurs pour le caractère d'aptitude au croisement du blé avec le seigle en utilisant du matériel développé dans l'unité pour la création de triticales primaires.

2^{ème} Partie: Analyses Phénotypiques et Génotypiques du Locus *SKr*

I. Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Lignées parentales

La population MP98 x Courtot utilisée pour cette étude est issue d'un croisement entre MP98, une lignée de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) apte au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L.) et la variété française Courtot (*Triticum aestivum* L. var. Courtot) inapte au croisement. Cette population sera ultérieurement nommée MP98 x Ct.

a. Courtot

Courtot (Ct), variété de blé d'hiver inscrite en 1974, est le premier blé tendre deminain à figurer au catalogue français. Sa petite taille (65 cm), avantageuse pour lutter contre le phénomène de verse, est liée à l'introduction des gènes de nanisme *Rht-B1* sur 4BS et *Rht-D1* sur 4DS (CADALEN *et al.* 1997; SOURDILLE *et al.* 1998) à partir de la variété japonaise "Norin 10". Il possède une bonne valeur boulangère, mais est assez sensible à certaines maladies comme l'oïdium, la septoriose et la fusariose. Toutefois, sa très bonne résistance à la verse et à de nombreuses rouilles et sa capacité de tallage lui assurent une bonne productivité. Ct comme la plupart des blés européens n'est pas apte au croisement avec le seigle (LAMOUREUX *et al.* 2002) et un maximum de compatibilité de 10% a été observé dans certains cas (GAY and BERNARD 1994; TIXIER *et al.* 1998).

b. Chinese Spring

Chinese Spring (CS), un blé tendre collecté en Chine au début du XX^{ème} siècle, a été utilisé comme référence dans les études de génétique et cytogénétique du blé hexaploïde au cours des dernières décennies. C'est un blé de printemps, non aristé, de grande taille (120 cm) ce qui le rend très sensible à la verse. Il est également sensible à de nombreuses maladies et insectes. Sa valeur agronomique est médiocre et sa qualité boulangère mauvaise. Cependant, CS est bien connu pour sa bonne aptitude au croisement avec les espèces apparentées telles que le seigle (Riley and Chapman 1967; Lange and Riley 1973), et l'orge (Snape *et al.* 1979; Fedak and Jui 1982; Falk and Kasha 1983; Sitch *et al.* 1985). CS est également capable de se croiser avec le maïs (*Zea mays* L.), propriété largement utilisée pour la production des lignées Haploïdes Doubles (HD) puisque la fécondation et l'obtention des embryons est possible mais l'albumen est manquant. Cette capacité générale à l'hybridation interspécifique a aussi permis l'obtention des séries aneuploïdes (monosomiques, ditelosomiques, lignées de délétion,...)

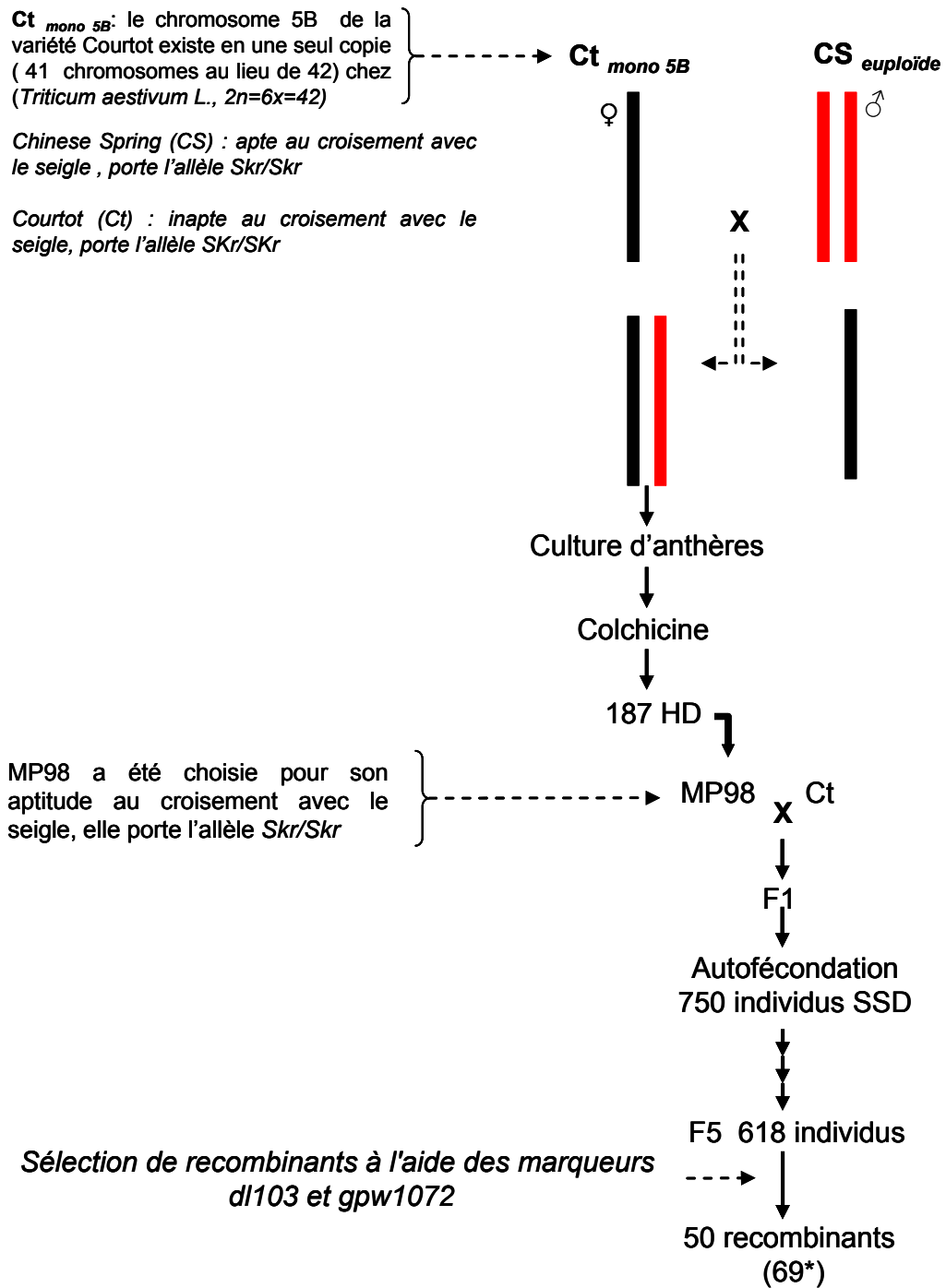


Figure 17 : Schéma de production de la lignée MP98 et de la population MP98 x Ct.

qui ont été et sont toujours très largement utilisées en cartographie chez le blé (SEARS 1954; ENDO and GILL 1996).

c. MP98

MP98 est l'une 187 des lignées HD issue de la population *Ct x CS* (cf. 1.2) pour laquelle les croisements ont commencé dans les années 1991/1992 puis ont été utilisés pour des analyses génétiques par FELIX *et al.* (1996) et CADALEN *et al.* (1997). MP98 est connue pour sa bonne aptitude (~70%) au croisement avec le seigle. Elle porte le fond génétique du blé croisable CS dans la région du locus d'aptitude au croisement *SKr* localisé par analyse de QTL sur le bras court du chromosome 5B (TIXIER *et al.* 1998) et plus particulièrement dans la partie distale (LAMOUREUX *et al.* 2002).

1.2. Population *Ct x CS*

La population *Ct x CS* a été créée à l'origine dans le cadre d'un programme visant à étudier la base génétique de caractères contrastées entre les deux variétés *i.e.* besoin en vernalisation, hauteur de la plante, caractéristiques de l'épi, précocité, et qualité boulangère. Un lot complet de lignées monosomiques (à 41 chromosomes) disponibles pour *Ct* a été croisé avec une lignée *CS* euploïde (à 42 chromosomes). Les hybrides F_1 euploïdes à 42 chromosomes ont été utilisés pour produire des populations d'haploïdes doublés. Parmi cette série de croisements, un croisement a été réalisé entre la lignée monosomique 5B de *Ct* (*Ct_{mono 5B}*) et *CS* euploïde (Figure 17). Par la suite, les 187 lignées HD de cette population ont été caractérisées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe), et ont servi à la détection de différents QTLs impliqués dans ce phénomène. Un QTL majeur, nommé *SKr*, a été détecté sur le bras court du chromosome 5B, un QTL mineur sur le 5BL (supposé être *Kr1*) et un autre QTL sur le chromosome 7AL moins fort que *SKr* mais plus fort que *Kr1* (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002) (cf. Figure 12).

1.3. Population *MP98 x Ct*

La population de backcross *MP98 x Ct* a été créée en 1998 (croisements réalisés à Clermont-Ferrand par Georges Gay à la demande Michel Bernard) pour étudier la ségrégation de *SKr* sur le bras court du 5B. L'autofécondation des plantes F_1 a conduit à obtenir une population F_2 constituée de 750 individus. Puis, ces individus ont été conduits en descendance monograine (Single Seed Descent, SSD) de F_2 jusqu'en F_5 (Figure 17). Suite à des conditions hétérogènes en serre mais surtout à des problèmes de fertilité à chaque génération, l'effectif final de la génération F_5 était de 618 SSD (Figure 17) (LAMOUREUX 2002).

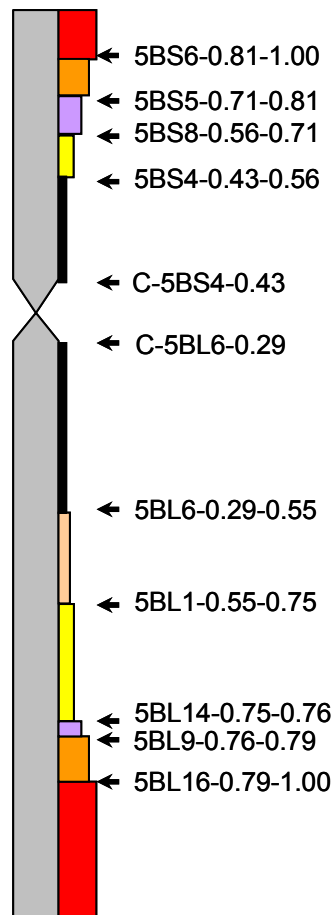


Figure 18 : représentation schématique des délétions sur le chromosome 5B de blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L.) cv. Chinese Spring. Les flèches indiquent le point où commence la fraction manquante du chromosome jusqu'au télomère.

1.4. Lignées aneuploïdes et lignées de délétions

Dans cette étude, la lignée Nullisomique 5B-Tétrasonique 5D (N5BT5D, 19 + 4 copies de 5D, moins deux copies de 5B) a été employée pour assigner les marqueurs spécifiques du chromosome 5B. De plus, nous avons utilisé des lignées de délétion terminales créées à partir de la variété Chinese Spring (ENDO and GILL 1996) et dans lesquelles une fraction de bras chromosomique est manquante ce qui permet d'assigner plus précisément la place des marqueurs sur un bras chromosomique. Les 4 lignées de délétion du bras court de 5B (5BS6-0.81-1.00, 5BS5-0.71-0.81, 5BS4-0.43-0.56 et 5BS8-0.56-0.71, Figure 18) ont été utilisées.

2. Conditions de croissance des plantes :

Les grains sont semés dans de petits pots en plastique contenant un mélange de tourbe et d'engrais à dégradation lente. Ensuite, les pots sont maintenus sur un tablard dans une serre contrôlée pour la température (18°C) et l'humidité (60%) avec une photopériode de 16 heures (en partie naturelle et complétée avec lampes à vapeur de sodium de 400 watts) jusqu'à l'obtention des plantes au stade 2-4 feuilles. Les plantes sont ensuite transférées en chambre de vernalisation à 6°C pendant 7 semaines puis en pleine terre dans une serre maintenue hors gel (10° C minimum jusqu'au 15 mars) (Figure 19A), l'hygrométrie moyenne est de 34% (60 de nuit, 20 de jour) entre avril et juin , la température et la photopériode sont naturelles de Mars à Juillet (l'ouverture des vitres étant réglée à 20°). Des traitements de protection contre les maladies (principalement l'oïdium) et insectes (principalement pucerons) sont effectués durant le développement des plantes dès l'apparition des premiers symptômes.

3. Evaluation de l'aptitude au croisement du blé avec le seigle

3.1. Matériel

Le test d'aptitude au croisement est réalisé en utilisant la variété de seigle cultivé *Secale cereale* L. Dankowskie Nowe. Les parents Ct, CS et MP98 et les individus SSD recombinants (issus de la population MP98 x Ct, Figure 17) sélectionnés entre les deux marqueurs moléculaires gpw1072 et dl103 dans l'étude précédente (LAMOUREUX 2002) ont été réévalués ainsi que certains individus pour lesquels une donnée de génotypage ou de phénotypage était manquante dans l'étude précédente (LAMOUREUX 2002). Au total, 116 SSD ont été incluses dans ce test.

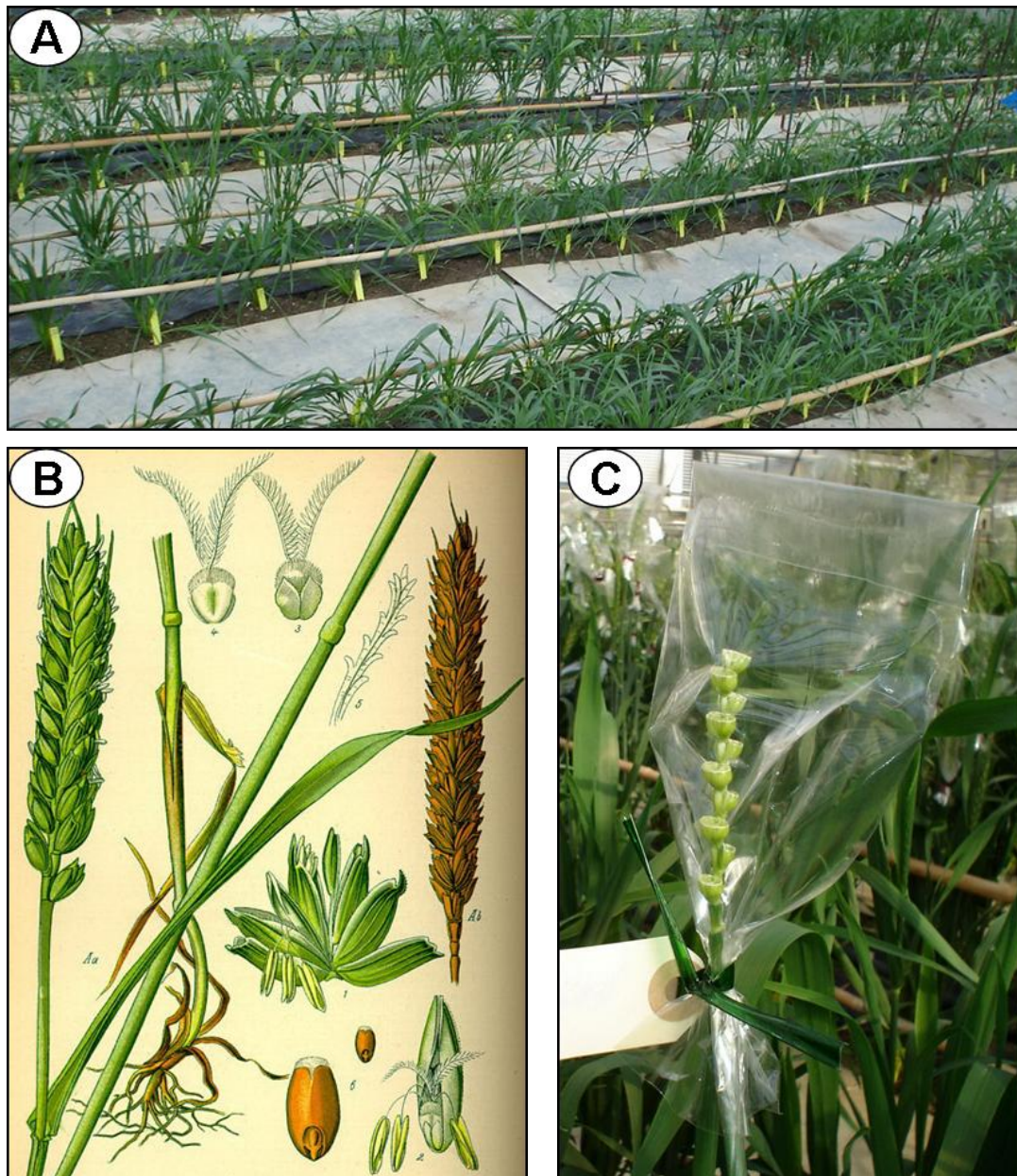


Figure 19 : A : Photo prise en serre pour les individus testés en 2005. B : différentes parties d'une plante de blé, source : (<http://www.plant-pictures.de/>). C : Epi de blé avec 20 fleurs émasculées (2 fleurs laissées sur chaque épillet x 10 épillets médians), protégées de la pollinisation non contrôlée par un sac.

3.2. Méthode

Le test d'aptitude au croisement se fait toujours en utilisant le blé comme parent femelle avec le pollen du seigle cultivé var. Dankowskie Nowe. L'émasculature du blé se fait généralement quand les deux tiers de l'épi sont sortis de la gaine, mais pour quelques lignées il a fallu attendre que l'épi soit complètement sorti. Deux à 4 épis et 20 fleurs (3 étamines/fleur, Figure 19B) par épi ont été émasculés 24-48h avant pollinisation pour chaque individu testé. Les 20 fleurs par épi ont été assurées en gardant les 5 épillets médians de chaque face de l'épi (Figure 19C). Toutes les fleurs de l'épillet sauf les deux fleurs extérieures ont été enlevées pour assurer une maturité uniforme de tout l'épi. Les autres épillets apicaux et basiques ont été aussi enlevés (Figure 19C). Les stigmas sont ensuite pollinisés par du pollen frais de seigle cultivé dans la même serre. La vitesse de développement différant entre blé et seigle, 3 semis de seigle (plantés à 7 jours d'intervalle) sont disponibles afin d'assurer une production de pollen constante durant les croisements. Avant et après pollinisation, les épis émasculés sont couverts par des sacs afin d'éviter des pollinisations non contrôlées (Figure 19C). Chaque épi est étiqueté avec le nom de l'individu, la date de l'émasculature, la date de la pollinisation et le nom du manipulateur. Un double de chaque lignée SSD est systématiquement mis en serre pour fournir une plante de remplacement au cas où un incident se produirait sur la première plante.

3.3. Contrôles

Afin d'assurer un phénotypage homogène, reproductible et de qualité pour un caractère difficile à évaluer, des contrôles de l'homogénéité des résultats issus des différents épis émasculés de chaque plante ont été réalisés deux fois après pollinisation (après 10 jours, la formation des grains peut déjà être observée dans l'épi). Lorsqu'une différence remarquable était observée entre deux épis d'une même plante, un troisième voire un quatrième épi ont été testés à partir de la même plante. Un contrôle supplémentaire a été réalisé l'année suivante (2006) pour les plantes dont les épis n'avaient pu être exploités lors du premier contrôle en 2005, faute de coïncidence de floraison. Ces précautions ont permis de réduire au mieux les erreurs expérimentales.

3.4. Calcul du pourcentage d'aptitude au croisement

40 à 50 jours après pollinisation, le nombre de grains obtenus par épi est compté et l'aptitude au croisement transformée en pourcentage en divisant le nombre de grains obtenus par épi par le nombre total de fleurs émasculées sur l'épi. Si un stigmate est endommagé lors

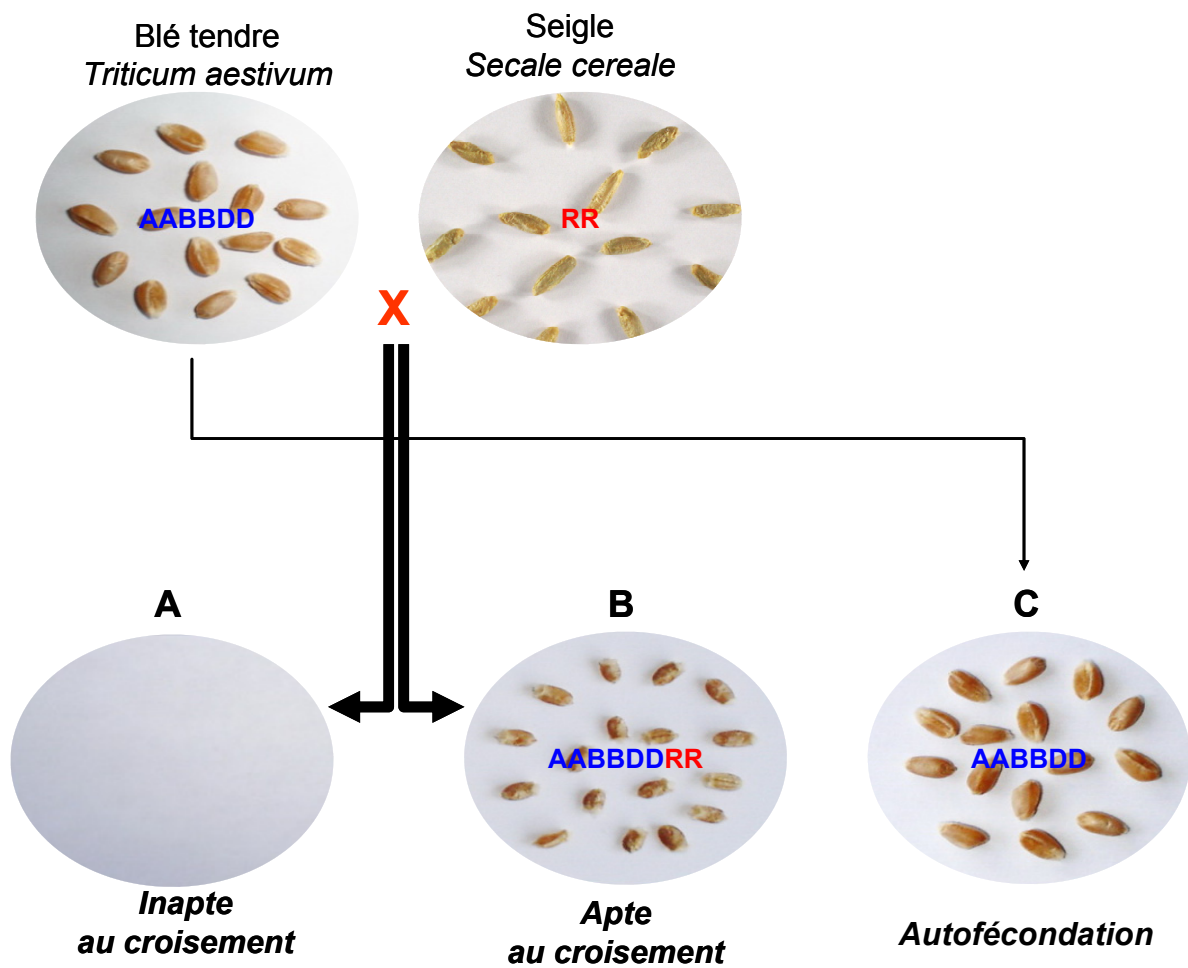


Figure 20: Résultats de croisements du blé avec le seigle (A, B) et d'autofécondation du blé (C).

de l'émasculation (observé lors de la pollinisation) ou si des grains non hybrides (autofécondation accidentelle) sont observés, une correction est réalisée en remplaçant la valeur 20 par la valeur corrigée. Le pourcentage moyen de l'aptitude au croisement est ensuite calculé à partir des rapports obtenus pour chacun des épis d'une même plante :

$$AC (\%) = \sum (((g1/f1) + (g2/f2) + \dots + (gn/fn))/E) * 100$$

Où : AC : aptitude au croisement exprimée en (%)

g : nombre de grains obtenus par épi.

f : nombre de fleurs émasculées par épi, normalement 20 fleurs.

E : nombre d'épis testés par plantes

Ce calcul est préférable à une estimation plus simplifiée du type $AC (\%) = (g \text{ total} / f \text{ total}) * 100$ car il permet de calculer un écart type et un intervalle de confiance qui rendent compte des erreurs expérimentales.

3.5. Définition des classes d'aptitude au croisement

Un individu est dit inapte au croisement (non croisable) lorsque la valeur d'aptitude observée est située dans l'intervalle observé pour le parent non croisable Courtot (0-10%) (Figure 20A). Un individu est dit apte au croisement (croisable) avec le seigle lorsque la valeur d'aptitude observée est incluse dans l'intervalle obtenu pour le parent croisable (ici MP98, 59-81%). Les grains hybrides blé-seigle comportent un albumen rempli suite à la réussite de la fécondation. L'aspect et la couleur des grains permettent de différencier les vrais hybrides des grains de blé qui ont pu se former (par castration mal faite ou contamination lors de la pollinisation) : les grains hybrides sont petits, ridés et sombres (Figure 20B), tandis que les grains de blé sont plus gros, lisses et clairs (Figure 20C).

4. Analyses moléculaires

4.1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN est extrait à partir de feuilles au stade de développement 8-10 feuilles afin d'assurer l'obtention d'une quantité suffisante d'ADN à partir de 3 à 5 g de matériel frais et pour éviter un impact négatif sur le développement futur des plantes. Après le prélèvement, les feuilles sont plongées immédiatement dans l'azote liquide, puis le matériel est broyé dans un mortier. Le broyat est ensuite transféré dans des tubes "Falcon 50 ml" et l'ADN extrait avec un protocole au CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, Sigma) 1.3X. Ce protocole permet d'obtenir une grande quantité d'ADN de qualité suffisante pour réaliser

plusieurs membranes de Southern. La qualité et la quantité d'ADN sont vérifiées sur gel d'agarose 0.8% et par dosage au spectrophotomètre (DO à 260 et 280 nm).

Tous les individus testés pour leur phénotype (116 SSDs, MP98, CS et Ct) ont été caractérisés avec les marqueurs moléculaires gpw1072 (SSR) et dl103 (RFLP) localisés dans la partie distale du bras chromosomique 5BS (délétion 5BS6-0.81-1.00, Figure 18) et utilisés pour la sélection des recombinants avant le début de ce travail de thèse. Les recombinants sélectionnés entre les deux marqueurs ont ensuite été caractérisés à l'aide de nouveaux marqueurs moléculaires. Des marqueurs sur les chromosomes 5BL et 5AL ont également été utilisés afin d'étudier la composition allélique aux locus *Kr1* et *Kr2*, respectivement.

4.2. Analyses par marqueurs SSR

Le polymorphisme des marqueurs SSR a été détecté par électrophorèse en utilisant deux méthodes :

1. La visualisation par la méthode de nitrate d'argent non-radioactive après migration sur gel d'acrylamide 6% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) pendant 2h à 2000V. Les marqueurs SSR ont été amplifiés par PCR dans les conditions suivantes : 3 µl d'ADN (10 ng/µl) ont été ajoutés à 2 µl de Tampon 10X contenant 31 mM MgCl₂, 4 µl de la solution Q, 0.8 µl de TAQ Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.4 µl d'un mélange de dNTP (10 mM), 1µl de chaque amorce (10µM) dans un volume total de 20µl. L'amplification est réalisée dans un thermo-cycler (MJ Research PTC-225) avec 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à 55-65 °C selon le T_m° spécifique des amorces utilisées, et 30s à 72°C, suivi d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

2. La visualisation par électrophorèse capillaire (ABI PRISM®3100, Applied Biosystems). Les amplifications sont réalisées dans un volume final de 7 µl dans les conditions suivantes : 3 µl d'ADN (10 ng/µl) ont été ajoutés à 0.65 µl de Tampon 10X, 0,04 µl Taq polymerase, 0.65 µl de mix d'amorces (amorces gauche avec extension M13 : 50 nM et amorce droite : 500 nM), 0.034 µl d'amorce M13 marquée, 0.27 µl d'un mélange de dNTP (10 mM) et complété avec 2.35 µl d'H₂O. L'amplification a été réalisée en utilisant un programme « universel » qui permet d'amplifier en même temps des SSRs ayant des températures de fusion spécifiques différentes (T_m°) :

Step	T °C	Time
1	95 °C	5 mn
2	95 °C	30 S
3	62 °C	30 S
	-1 °C per cycle	
4	72 °C	30 S
5	GoTo 2,	7 times
6	95 °C	30 S
7	55 °C	30S
8	72 °C	30 S
9	GoTo 6,	30 times
10	95 °C	30 S
11	56 °C	30 S
12	72 °C	30 S
13	GoTo 10,	8 times
14	72 °C	5 mn
15	15° C	for ever
16	End	

4.3. Analyses par marqueurs RFLP

20 µl d'ADN génomique (1µg/µl) de chaque lignée parentale et chaque individu de la population ont été individuellement digérés par 5 enzymes de restriction : *EcoRI*, *EcoRV*, *DraI*, *HindIII* et *BamHI* (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA) en utilisant 4 unités d'enzyme pour chaque 1 µg d'ADN génomique. La réaction de digestion est complétée à 35 µl avec 3.5 µl de Tampon 10X approprié pour chaque enzyme et de H₂O et est incubée à 37°C pendant 3h minimum. L'ADN digéré est alors séparé sur gel d'agarose 1% (Sigma) pendant 16h à 35V. L'ADN est transféré sur une membrane de nylon (Bio-Rad, Hercules, CA) par transfert alcalin (NaOH 0,4 M et NaCl 35g/L) pendant 24h. Les membranes sont ensuite hybridées (Southern) à l'aide de sondes marquées radio-activement par du dCTP³² en utilisant le kit de marquage Amersham (Megaprime DNA Labelling System kit, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK, www6.gelifesciences.com/). Après hybridation pendant une nuit à 65°C dans un four rotatif, les membranes sont rincées 3 fois (30/5/5 mn) avec un tampon 0.5x SSC, 0.1% SDS et emballées dans un film plastique pour éviter la dessiccation et la fixation des sondes de manière définitive. La membrane est ensuite mise en contact avec un film auto-radiographique dans une cassette puis stockée à -80°C de 2 à 5 nuits selon l'intensité du signal. Le film est ensuite développé et séché (développeuse automatique Amersham).

5. Analyses statistiques et bioinformatiques

La cartographie génétique a été réalisée à l'aide du logiciel Mapmaker/Exp v3.0b (LANDER *et al.* 1987). La carte génétique a été calculée en utilisant la fonction de Kosambi (KOSAMBI 1944) avec un seuil de LOD (logarithm of the odd) égal à 3. Le calcul des distances génétiques sur la population de 50 recombinants a été réalisé en prenant en compte la taille totale de la population *i.e.* 618.

Lors du phénotypage, le classement des individus s'est fait sur la base du calcul de la valeur moyenne d'aptitude au croisement exprimée en (%) et du calcul de l'écart type (ET) et de l'intervalle de confiance (IC). Les pourcentages obtenus ont été analysés à l'aide du test de Student-Newman-Keuls au seuil $\alpha = 0.05$ en utilisant le logiciel SAS (SAS system).

Les données génotypiques et phénotypiques ont été testées pour leur écart à la ségrégation attendue de 1:1 pour une population SSD issue d'une génération F_6 par un test du χ^2 .

Les recombinants SSD sélectionnés entre les marqueurs gpw1072 et dl103 ont été également testés par une analyse de corrélation en utilisant la fonction disponible sous Microsoft Excel 2003 pour la détection ou non de l'effet de *Kr1* (5BL) et de *Kr2* (5AL).

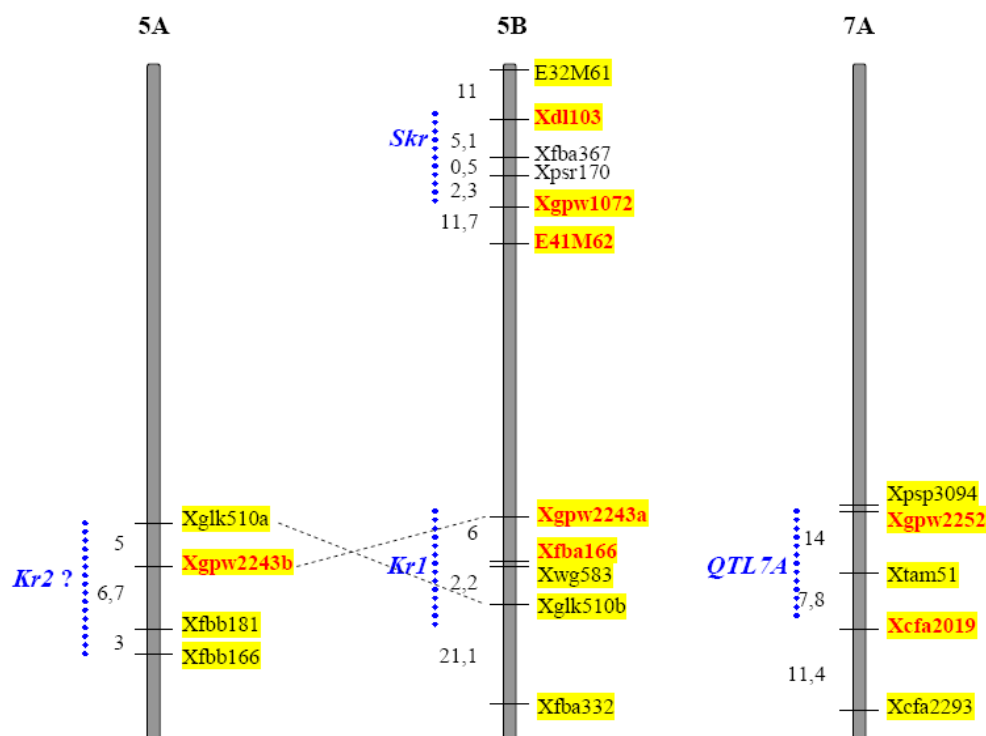


Figure 21 : Carte schématique des locus de compatibilité caractérisés par analyse QTL sur la population MP98 x Ct. En rouge, les marqueurs utilisés pour détecter l'effet des locus. D'après (LAMOUREUX 2002).

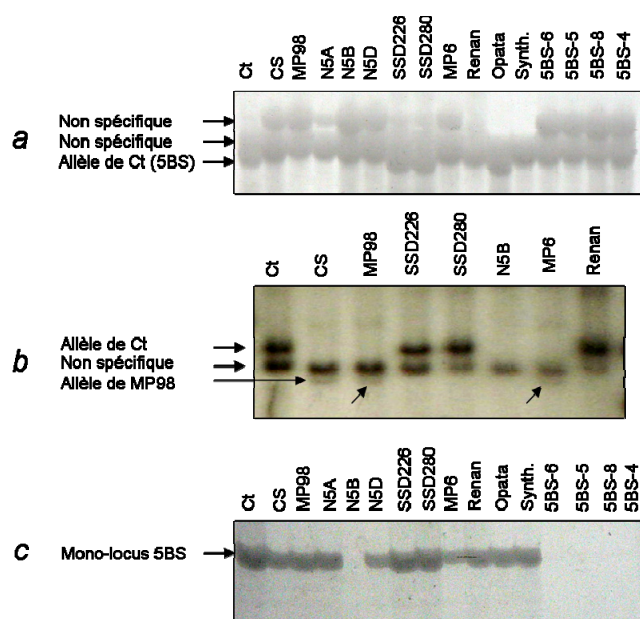


Figure 22 : Caractérisation du polymorphisme des marqueurs gpw1072 et dl103. (a) gpw1072 sur gel d'acrylamide, (b) dl103 en RFLP avec l'enzyme *Bam*HI, (c) dl103 en PCR sur gel d'acrylamide.

II. Résultats

Ce projet de thèse fait suite à des travaux réalisés entre 1998 et 2002 au laboratoire qui avaient permis grâce à une analyse QTL sur une population issue du croisement de Ct x CS d'identifier un QTL majeur, appelé SKr, gouvernant l'aptitude au croisement (AC) sur le bras court du chromosome 5BS (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002). Afin d'initier le clonage positionnel de SKr, une population de 618 SSD avait été développée à partir d'un rétrocroisement entre la lignée HD apte au croisement avec le seigle MP98 et le parent non croisable Courtot (*cf.* matériel et méthodes, Figure 17). Le phénotypage de cette population en génération F₅ et son génotypage à l'aide de marqueurs moléculaires avaient permis de localiser approximativement le QTL SKr en position plus proche du marqueur dl103 (Figure 21) (LAMOUREUX 2002).

Sur la base de ces résultats, une sous population de 69 individus présentant de la recombinaison entre les marqueurs gpw1072 et dl103 avait été sélectionnée sur le postulat que le gène était localisé entre ces 2 marqueurs. Mon travail de thèse a débuté avec comme objectifs la confirmation des phénotypes et génotypes des recombinants, (2) l'analyse des données pour établir le type de ségrégation du gène SKr dans la population et (3) l'établissement d'une carte génétique à plus haute densité permettant une localisation robuste de SKr par rapport aux marqueurs et dans un intervalle de taille réduite afin d'initier les étapes suivantes du clonage positionnel.

1. Sélection de la population recombinante SSD

1.1. Caractérisation des marqueurs gpw1072 et dl103 utilisés pour la sélection des recombinants

Le marqueur microsatellite gpw1072 est polymorphe entre MP98 et Ct en électrophorèse sur gel d'acrylamide 6%. Le polymorphisme est de type dominant avec une bande facilement cartographiable pour l'allèle du parent « Ct » et aucune bande spécifique pour l'allèle du parent « MP98 » (Figure 22a).

Le marqueur RFLP dl103 est originaire d'un fragment AFLP amplifié avec les amorces E36 (5'GACTGCGTACCAATTCACC3') et M49 (5'GATGAGTCCTGAGTAACAG3') puis prélevé sur gel et cloné (LAMOUREUX *et al.* 2002). Le clone résultant, nommé dl103, a été utilisé ici comme sonde RFLP pour tester le polymorphisme entre les deux parents de la population

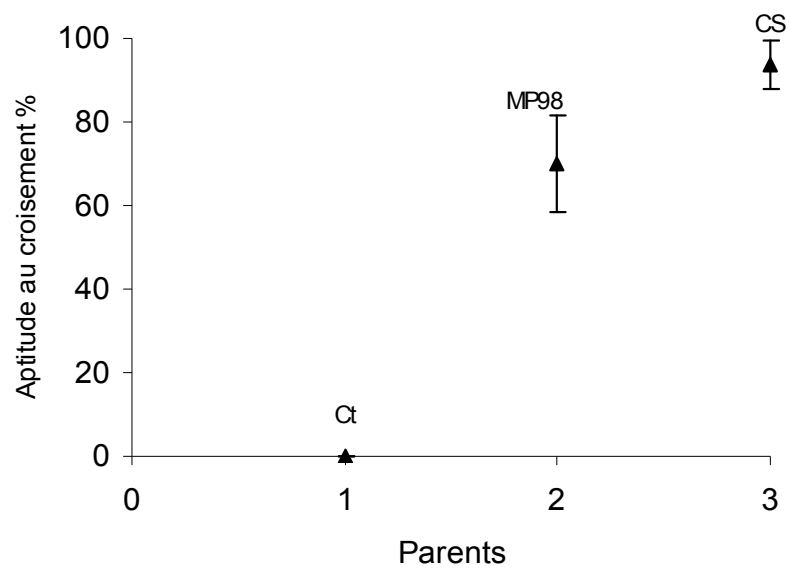


Figure 23 : Aptitude des parents Ct, MP98 et CS au croisement avec le seigle. Moyenne et intervalle de confiance au seuil de $\alpha=0.05$.

MP98 et Ct en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI*, *DraI*, *BamHI*, *HindIII* et *EcoRV*. Le profil le plus lisible a été obtenu avec les enzymes *DraI* et *BamHI*, et cette dernière a été choisie pour la cartographie dans la population recombinante (Figure 21b). Une paire d'amorces spécifique de l'allèle du chromosome 5B était également disponible pour tester dl103 par PCR (LAMOUREUX 2002). Le marqueur PCR a révélé un polymorphisme entre les parents MP98 et Ct sous forme d'une différence d'intensité de bande (plus intense chez Ct) (Figure 21c). Cependant, la différence est subtile et ne permet pas de distinguer les homozygotes des hétérozygotes au contraire du marqueur RFLP. Dans son étude (LAMOUREUX 2002) n'a utilisé dl103 que par PCR et l'analyse a donc été réalisée avec 2 marqueurs de type dominant.

1.2. Sélection des recombinants

Les 116 SSD disponibles au début de l'étude incluaient des individus recombinants, des individus dont le génotype et/ou le phénotype étaient à confirmer et des individus supposés être double recombinants. L'analyse moléculaire des 116 SSD à l'aide des marqueurs gpw1072 et dl103 (par RFLP) a montré que seuls 50 d'entre eux étaient de véritables recombinants entre les marqueurs dl103 et gpw1072 (*cf.* Annexe 1) tandis que 19 étaient potentiellement des doubles recombinants si l'on se basait sur l'hypothèse que le gène était placé entre les 2 marqueurs (Annexe 1).

2. Evaluation de l'aptitude au croisement avec le seigle

2.1. Evaluation des parents et définition des seuils pour les classes d'aptitude au croisement

L'évaluation de l'aptitude au croisement chez les parents de la population a été réalisée sur Ct, MP98 et CS (le donneur de l'aptitude au croisement de MP98).

Chinese Spring : Sur 4 épis analysés, 18, 19, 19 et 19 grains ont été obtenus ce qui aboutit à respectivement 90%, 95%, 95% et 95% d'aptitude au croisement (Annexe 1). Ainsi pour Chinese Spring, l'aptitude au croisement AC (exprimée en % \pm l'écart de la valeur moyenne avec un intervalle de confiance au seuil de $\alpha = 0.05$) est de 93.8% \pm 5% (Figure 23).

MP98 : La lignée parentale MP98 a montré une bonne aptitude au croisement avec le seigle (Figure 23). Cette valeur a été obtenue suite à la pollinisation de 3 épis qui ont résulté

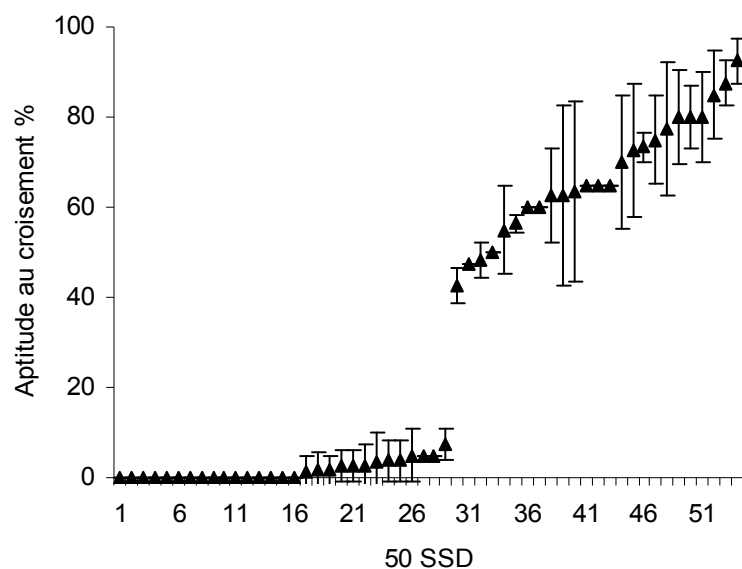


Figure 24: Evaluation de l'aptitude au croisement pour 50 SSD sélectionnés entre les deux marqueurs gpw1072 et dl103.

Tableau 4 : Test χ^2 pour une ségrégation 1 : 1 , sur 50 SSD (a) et sur 69 SDD (b). P: probabilité, ns: non significatif, ddl: degré de liberté, * significatif à <5%, ** significatif à <1%.

Marqueur	a			b			ddl
	χ^2 1 : 1	P		χ^2 1 : 1	P		
SKr	0,00	1,00	ns	2,45	0,12	ns	1
STS-E41M48	0,08	0,77	ns	0,13	0,72	ns	
gwm234	0,19	0,66	ns	0,75	0,39	ns	
Xdl103	0,08	0,78	ns	2,52	0,11	ns	
bcd873	0,19	0,66	ns	0,24	0,62	ns	
fb276	0,00	1,00	ns	0,00	1,00	ns	
gwm443	0,72	0,40	ns	0,13	0,72	ns	
gpw4098	0,53	0,47	ns	5,55	0,02	*	
gpw1072	0,18	0,67	ns	4,91	0,03	*	
wmc149	0,18	0,67	ns	4,91	0,03	*	
fba367	3,27	0,07	ns	9,29	0,00	**	

dans la production de 13, 14 et 15 grains i.e. 65%, 70% et 75% d'aptitude au croisement (Annexe 1). Donc, la valeur moyenne de l'AC pour la lignée MP98 est de $70\% \pm 11.32\%$ dans un intervalle de 59% à 81%. Dans la population MP98 x Ct tous les individus présentant des % d'aptitude au croisement situés dans cet intervalle seront considérés comme "croisables".

Courtot (Ct) : le parent Ct a montré une inaptitude totale au croisement avec le seigle (Figure 23). Aucun grain n'a été obtenu pour 3 épis émasculés et pollinisés avec le pollen de seigle et la valeur d'AC est donc de 0%. Ce résultat est légèrement différent des études précédentes qui mentionnaient parfois jusqu'à 10% d'aptitude au croisement chez le parent Ct (GAY and BERNARD 1994; TIXIER *et al.* 1998). En tenant compte de ces observations, nous pouvons définir l'intervalle de la classe "non croisables" pour des valeurs comprises entre 0 et 10%.

2.2. Evaluation des SSDs

Parmi les 69 lignées SSD potentiellement recombinantes (50 recombinants + 19 double recombinants évaluées (*cf.* II.1.2), 41 ont été classés non croisables et 28 SSD ont montré une bonne aptitude au croisement avec le seigle (Annexe 1). En comparaison avec la valeur seuil du χ^2 de 3,84 pour 1 ddl et $\alpha = 0,05$, la valeur de χ^2 obtenue pour les 69 SSD ($\chi^2 = 2.45$; $P < 0.12$, 1 ddl) est à la limite de la signification pour une ségrégation 1:1 dans une population de type F_6 (Tableau 4). Par contre, si l'on considère que *SKr* n'est pas localisé entre les 2 marqueurs mais en position distale par rapport à ceux-ci, l'analyse des recombinants montrent que 25 sont croisables et 25 non croisables (Figure 25) ce qui correspond à une ségrégation mendélienne parfaite de 1:1 ($\chi^2 = 0$; $P < 0.01$, 1 ddl, NS, Tableau 4) pour *SKr*. Ainsi, l'analyse phénotypique de la population de recombinants ne confirme pas l'hypothèse de départ et tend à montrer que *SKr* est plutôt localisé en position distale par rapport aux deux marqueurs initiaux.

Parmi les 25 individus non croisables, 11 montrent de très faibles taux d'AC avec 1.3%, 1.7% (2), 2.5% (2), 3.8% (2), 5% (3) et 7.5% maximum. Parmi les 25 SSD croisables, 16 ont des taux compris dans l'intervalle de MP98 (59-81%) et 9 ont des taux soit légèrement inférieurs (42.5%, 47.5%, 48.3%, 50%, 55% et 56,4) soit légèrement supérieurs (85%, 87.5 et 92.5%) (Annexe 1, Figure 24). Cependant ces légères variations ne constituent pas une déviation significative et les individus peuvent être toujours considérés dans la classe généralement croisable (Figure 24). Ainsi, les résultats de phénotypage montrent deux classes d'aptitude au croisement bien distinctes ouvrant la possibilité de cartographier plus précisément le gène *SKr* dans l'analyse de liaison.

Tableau 5 : Marqueurs SSR testés pour leur polymorphisme entre MP98 et Ct.

SSR	Forward (5'...3')	Reverse (5'...3')	Référence
gwm234	GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG	CTCATTGGGGTGTGTACGTG	(SOMERS <i>et al.</i> 2004; SOURDILLE <i>et al.</i> 2004)
gwm68	AGGCCAGAATCTGGGAATG	CTCCCTAGATGGGAGAAGGG	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
gwm443	GGGTCTTCATCCGGAACCTCT	CCATGATTATAAAATCCACC	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
wmc149	ACAGACTTGTTGGTGCCGAGC	ATGGGCGGGGTGTAGAGTTTG	(SOMERS <i>et al.</i> 2004; SOURDILLE <i>et al.</i> 2004)
wmc773	GAGGCTTGCATGTGCTTGA	GCCAACTGCAACCGGTACTCT	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
wmc630	ATAATGCACGGTAGGACTGAGG	CATACTGAGACAATTGGGGGT	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
wmc47	GAAACAGGGTTAACCATGCCAA	ATGGTGCTGCCAACACATACA	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
barc240	AGAGGACGCTGAGAAGTTAGAGAA	GCGATCTTTGTAATGCATGGTGAAC	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
barc21	GCGTCTCCGGTTTGTGTTTACTTTTC	GCGTTAGGGCTATGGCGGTGTG	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
barc32	GCGTGAATCCGGAACCCAATCTGTG	TGGAGAACCTTCGCATTGTGTCATTA	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
gpw1056	TATCTGTGGGGTGCAATGTG	GATCTCTTCTCCCTCTCCC	Pierre Sourdille (communication directe)
gpw7180	TAATTGCAAGGAGGATGTGCG	ATGAACAATTCGCCACTCAG	Pierre Sourdille (communication directe)
gpw7066	GATCGTAGCAAAATCCTCCA	ATGCCGACGTAGTGCTTGC	Pierre Sourdille (communication directe)
gpw4098	ATTACCACGGCTCAATGTCC	TCTACTCATGTGCGGCTC	Pierre Sourdille (communication directe)
gpw1072	GGAACACTGCCATCACATA	CACCTTCAGCACCATGATCA	(LAMOUREUX <i>et al.</i> 2002)
cfid5	TGCCCTGTCCACAGTGAAG	TTGCCAGTTCCAAGGAGAAT	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)
cfid60	TGACCGGCATTTCAGTATCAA	TGGTCACTTTGATGAGCAGG	(SOMERS <i>et al.</i> 2004)

Tableau 6 : Marqueurs RFLP testés pour leur polymorphisme entre MP98 et Ct.

Marqueurs	Taille d'insert (kb)	Vecteur de clonage	enzyme d'excision	Antibiotique	Source
bcd873	0,8	pBlueSK	EcoRI	ampicilline	(HEUN <i>et al.</i> 1991)
cdo344	1,3	pBlueSK	EcoRI, XhoI	ampicilline	(HEUN <i>et al.</i> 1991)
cdo749	1,6	pBlueSK	EcoRI, XhoI	ampicilline	(HEUN <i>et al.</i> 1991)
cdo959	1,8	pBlueSK	EcoRI, XhoI	ampicilline	(HEUN <i>et al.</i> 1991)
dl103	0,7	pGEM-T Easy	EcoRI	ampicilline	(LAMOUREUX <i>et al.</i> 2002)
fba367	0,7	pBlueScript	PstI	ampicilline	(1995) Le Catalogue des Clones Genoble
fb12	1,1	pBlueScript	PstI	ampicilline	Le Catalogue des Clones Genoble (1995)
fb121	1,2	pBlueScript	PstI	ampicilline	Le Catalogue des Clones Genoble (1995)
fb276	1	pBlueScript	PstI	ampicilline	Le Catalogue des Clones Genoble (1995)
fb277	2	pBlueScript	PstI	ampicilline	Le Catalogue des Clones Genoble (1995)
ksuD18	1,1	pUC18	PstI	ampicilline	(GILL <i>et al.</i> 1991)
mta9	0,9	pBlueScript	PstI	ampicilline	(GAUTIER <i>et al.</i> 1994; SOURDILLE <i>et al.</i> 1996)
psr1204	0,3	pUC18	HindIII, EcoRI	ampicilline	(KARAKOUSIS <i>et al.</i> 2003)
psr170	1	pUC18	HindIII, EcoRI	ampicilline	(DEVOS <i>et al.</i> 1992)
psr326	0,9	pUC18	HindIII, EcoRI	ampicilline	(GALIBA <i>et al.</i> 1995)
psr929	1,1	pUC18	HindIII, EcoRI	ampicilline	(KARAKOUSIS <i>et al.</i> 2003)

3. Cartographie génétique fine au locus *SKr*

3.1. *Exploitation des bases de données*

Afin de saturer la région de *SKr* par des marqueurs moléculaires et de déterminer la position précise du gène dans l'intervalle génétique, nous avons recherché dans les bases de données publiques tous les marqueurs cartographiés sur le bras chromosomique 5BS. En plus de gpw1072 et dl103, un total de 16 marqueurs SSR (Tableau 5) et 15 marqueurs RFLP (Tableau 6) ont été identifiés et examinés pour leur polymorphisme entre les parents de la population MP98 x Ct. Huit d'entre eux comprenant 4 microsatellites : gwm234, gpw4098, wmc149 et gwm443, 3 marqueurs RFLP : fba367, fbb276 (*DraI*) et bcd873 (*BamHI*) et un marqueur STS (STS-E41M48, F-5'TCCTACCTCCATTCCCCTTT3', 5'TCAAAATGAATCGGAAGGGT3', WILLIAMS *et al.* 2003) se sont montrés polymorphes entre les deux parents. Tous les marqueurs étaient de type co-dominant sauf le marqueur STS-E41M48 de type dominant et révélant uniquement un produit chez le parent MP98.

3.2. *Analyses statistiques et bioinformatiques*

3.2.1. *Cartographie génétique*

L'analyse de liaison a été réalisée en deux temps en utilisant Mapmaker/exp v3.0b et en tenant compte de la taille totale de la population MP98 x Ct (618 SSD). Une première analyse réalisée avec les 69 SSD aboutit à une carte de 9.3 cM, (Figure 25a). Un test statistique χ^2 de la ségrégation des marqueurs montre que les marqueurs proximaux gpw4098, wmc149, gpw1072 et fba367 ne suivent pas une ségrégation normale 1:1 (Tableau 4). L'origine du déséquilibre de liaison est à trouver dans les 19 SSD supposés être des doubles recombinants, et qui montrent pour 16 d'entre eux l'allèle de MP98 vs 3 seulement possédant l'allèle de Ct (*cf.* Annexe 1). Par contre, si l'on réalise l'analyse de liaison sans les 19 "doubles recombinants" et en ne tenant compte que des 50 SSD dont la ségrégation phénotypique est normale (*cf.* ci-dessus), la carte génétique est de 6.1 cM (Figure 25b) et la ségrégation des 10 marqueurs moléculaires est validée par un test du χ^2 (Tableau 4). Cette carte montre également que les 8 nouveaux marqueurs sont tous en position proximale par rapport à *SKr*, le plus proche étant STS-E41M48 (Figure 25b), ce qui confirme que le gène *SKr* est bien en position distale par rapport aux marqueurs gpw1072 et dl103 et que la population de recombinants sélectionnée initialement est biaisée.

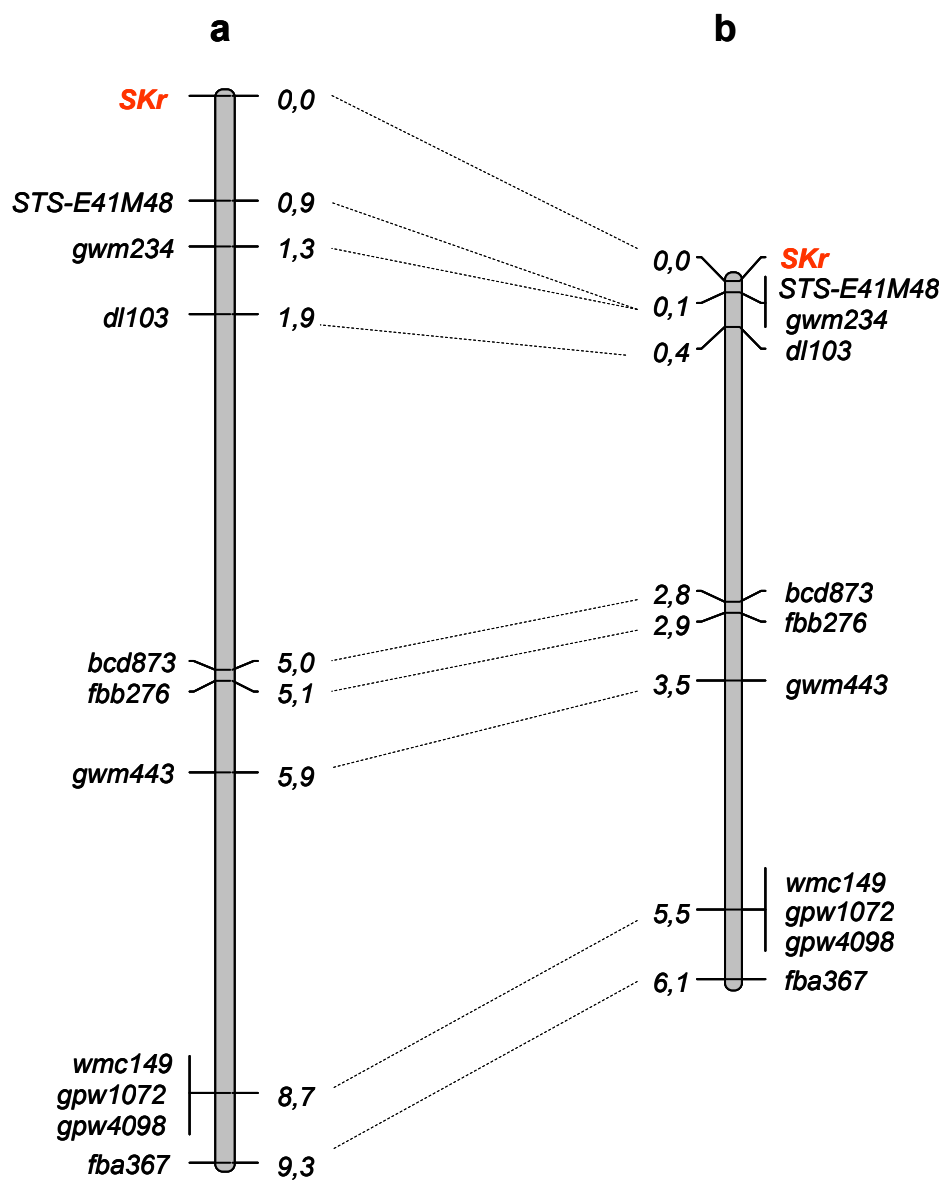


Figure 25 : Carte génétique initiale construite pour 69 SSDs (a) et pour 50 SSDs (b).

3.2.2. Caractérisation des locus *Kr1* et *Kr2*

Kr1 et *Kr2*, les premiers gènes identifiés pour l'aptitude au croisement du blé avec le seigle (LEIN 1943; RILEY and CHAPMAN 1967) et avec *Hordeum bulbosum* (SNAPE *et al.* 1979; FALK and KASHA 1981; FALK and KASHA 1983) ont été localisés respectivement sur les bras long des chromosomes 5B et 5A (LANGE and RILEY 1973; SITCH *et al.* 1985) avec un effet plus fort de *Kr1*. Plus récemment, au cours de l'analyse QTL qui a révélé la présence de *SKr* sur le bras court du chromosome 5BS (TIXIER *et al.* 1998), un QTL d'effet mineur qui pourrait correspondre à *Kr1* a été détecté sur le bras long du chromosome 5B alors qu'aucun effet n'était détecté sur le bras long du chromosome 5A pour *Kr2*. Ces résultats avaient conduit à suggérer que Courtot le parent non croisable portait la combinaison d'allèles *Kr1Kr1/kr2kr2* et que Chinese Spring (croisable) portait les allèles *kr1kr1/kr2kr2*.

Dans notre étude, les deux classes phénotypiques distinctes obtenues (croisable et non croisable) au locus *SKr* dans la population MP98 x Ct suggèrent que l'effet de *SKr* est plus fort que celui de *Kr1* et que les légères variations observées dans les valeurs d'aptitude au croisement (Figure 24, Annexe 1) pourraient provenir de l'effet des allèles de *Kr1* ou d'autres QTL mineurs encore présent dans la lignée MP98. Pour étudier cette question, nous avons caractérisé les lignées parentales ainsi que les 50 lignées SSD recombinantes avec un lot de marqueurs situés, d'après la littérature et des échanges d'information avec G. Moore (JIC, UK) qui clone actuellement le gène *Kr1*, à proximité des locus *Kr1* et *Kr2* sur les chromosomes 5BL et 5AL. En tout, 19 marqueurs SSR ont été testés pour chacun des locus sur les parents des croisements MP98, CS et Ct (Tableau 7).

Huit et six marqueurs SSR se sont révélés polymorphes respectivement sur les chromosomes 5BL et 5AL (Tableau 7). Tous les marqueurs polymorphes entre Ct et CS ont présenté l'allèle de CS dans la lignée MP98 aux deux locus et il semble donc que MP98 ait hérité des allèles récessifs de Chinese Spring au locus *Kr1* et *Kr2*. Si l'on suppose que Ct possède également un allèle récessif à *kr2*, les variations observées dans les classes d'aptitude au croisement pourraient provenir de l'allèle *Kr1* apporté par Courtot. L'analyse des 50 SSDs avec les 3 SSR couvrant la région de *Kr1* sur 5BL (gwm213, gwm371 et gwm499) et les 4 SSR couvrant la partie distale de 5AL ne montre aucune corrélation entre l'aptitude au croisement et la composition allélique aux locus *Kr1* et *Kr2* (Tableau 8).

Tableau 7 : Marqueurs testés sur les chromosomes 5BL (*Kr1*) et 5AL (*Kr2*), P : polymorphe, NP : non polymorphe.

5BL (<i>Kr1</i>)		5AL (<i>Kr2</i>)	
P	NP	P	NP
gwm213	gpw3035	gwm156	gwm639
gwm499	gpw8092	gpw4004	gpw5207
gwm554	gpw7309	gwm186	gwm617
gpw3191	gpw5206	gpw4228	gwm666
gwm271	gpw7425	gpw7007	gpw2059
gpw4160	gwm408	gpw2136	gpw5173
gpw3076	gpw5257		cfa2141
gwm371	gpw3183		gpw8261
	gpw4479		gpw2273
	gpw4483		gwm126
	wmc73		gwm6
			gwm410
			gpw4095

Tableau 8 : Analyse de corrélation entre 3 marqueurs sur le chromosome 5BL (*Kr1*), 4 marqueurs sur le 5AL (*Kr2*), gwm234 sur 5BS (*SKr*) et le phénotype (l'aptitude au croisement). L'allèle de Ct a été remplacé par la valeur 0 et l'allèle de MP98 par la valeur 1, les hétérozygotes ont été considérés comme données manquantes.

Chromosome		5BL (<i>Kr1</i>)			5AL (<i>Kr2</i>)				5BS (<i>SKr</i>)	
	Marqueurs	gwm213	gwm371	gwm499	gpw2136	gwm617	gpw7007	gwm666	gwm234	Phénotype
5BL	gwm213	1,00	0,80	0,56	-0,14	-0,13	0,08	0,07	-0,23	-0,24
	gwm371		1,00	0,76	-0,12	-0,16	0,11	0,13	-0,20	-0,26
	gwm499			1,00	-0,31	-0,08	0,17	0,24	-0,05	-0,11
5AL	gpw2136				1,00	0,02	0,20	0,11	-0,25	-0,22
	gwm617					1,00	0,48	0,50	-0,09	-0,12
	gpw7007						1,00	1,00	-0,04	-0,03
	gwm666							1,00	0,02	0,04
5BS	gwm234								1,00	0,96
	Phénotype									1,00

Ces résultats suggèrent donc que Courtot ne porte pas un allèle fort de *Kr1* et que la légère variation phénotypique observée provient de l'effet d'autre locus mineurs. Ce résultat confirme des observations antérieures sur la variation allélique pour les gènes de l'aptitude au croisement (FALK and KASHA 1983). D'autre part, cela fournit également une explication sur l'identification de *Kr1* comme QTL mineur dans la population Ct x CS alors qu'il avait été identifié dans d'autres lignées comme un gène ayant un effet majeur (RILEY and CHAPMAN 1967; LANGE and RILEY 1973; JALANI and MOSS 1980; SITCH *et al.* 1985). C'est cette faiblesse qui a permis de mettre en évidence le rôle de *SKr* dans ce croisement particulier dans lequel *Kr1* n'a pratiquement aucun effet.

En conclusion, l'analyse phénotypique et génotypique que nous avons réalisée pour jeter les bases du projet de clonage positionnel montre que *SKr* se comporte comme un gène majeur dominant dans la population MP98 x Ct, (2) la sélection initiale des recombinants sur le postulat d'une présence de *SKr* entre les marqueurs gpw1072 et dl103 était erronée, ce qui a introduit un biais dans les analyses de distances génétiques puisque tous les recombinants n'ont pas été retenus en particulier ceux situés entre dl103 et *SKr*, (3) seuls 50 SSD présentent de la recombinaison dans l'intervalle génétique étudié et (4) les effets d'autres QTLs sont très mineurs. Sur la base de ces résultats, la population de 50 recombinants a servi de base pour la suite des analyses et la construction de cartes génétiques et physiques à haute résolution autour du gène *SKr* (cf. 3^{ème} partie).

III. Discussion

La première étude réalisée au laboratoire sur une population de 187 lignées HD issues d'un croisement entre la variété française Courtot non croisable et la variété chinoise hautement croisable Chinese Spring. TIXIER *et al.* (1998) avaient permis d'identifier pour la première fois le gène *SKr* sur le bras court du chromosome 5B et un QTL à effet mineur sur le bras chromosomique 5BL, supposé être *Kr1*, précédemment identifié sur ce bras chromosomique (LANGE and RILEY 1973; SITCH *et al.* 1985). L'effet majeur de *SKr* ainsi que l'effet mineur de *Kr1* a été confirmé par la suite (LAMOUREUX *et al.* 2002) en localisant *SKr* cette fois plus précisément sur la partie distale du chromosome 5BS, à proximité du marqueur moléculaire dl103, mais sans confirmation de la position de ce marqueur par rapport à *SKr*. LAMOUREUX (2002) a ensuite dans un travail de thèse continué la caractérisation de *SKr* sur une population F₅ de 618 SSD issus d'un croisement entre la lignée MP98 croisable, l'une des 187 HD, et le parent récurrent Courtot. L'analyse QTL de cette nouvelle population a également confirmé l'effet majeur de *SKr* (5BS) et permis d'émettre des hypothèses sur la localisation de *SKr* plus proche du marqueur dl103 sans toutefois préciser son orientation distale ou proximale. LAMOUREUX (2002) a finalement sélectionné une sous-population de recombinants entre les marqueurs moléculaires gpw1072 et dl103 et un total de 116 SSDs nous a été transmis pour initier le travail de thèse.

Dans cette première partie des travaux, nous avons décidé dans un premier temps de vérifier et valider statistiquement les données phénotypiques et génotypiques obtenues précédemment sur la population recombinante (LAMOUREUX 2002) avant d'initier une cartographie génétique plus dense en exploitant les bases de données publiques. L'analyse statistique des données phénotypiques et génotypiques obtenues en 2005 et 2006 nous a finalement permis de traiter *SKr* comme un facteur mendélien, étape essentielle à la poursuite de l'objectif final qui est d'isoler *SKr* par clonage positionnel. Deux résultats principaux nous ont permis de considérer *SKr* comme un facteur mendélien. Le premier est l'observation de deux classes bien distinctes d'aptitude au croisement, une classe non croisable (0-10%) et une classe croisable s'étendant de 59 à 81%. Quelques individus ont montré des valeurs légèrement inférieures ou supérieures aux intervalles définis par les parents de la population nous amenant à nous interroger sur l'origine de ces petites variations. Plusieurs facteurs extérieurs peuvent provoquer de telles variations pendant les tests d'aptitude au croisement interspécifique. L'un des facteurs qui a bien été mis en évidence dans les croisements blé x orge (MOLNAR-LANG and SUTKA 1994), blé x seigle (TAIRA and LARTER 1977) et blé x

Hordeum bulbosum (SITCH and SNAPE 1987) est la température lors de la pollinisation, du développement des tubes polliniques, de la fécondation et du développement embryonnaire. SITCH and SNAPE (1987) ont montré ainsi que la température ambiante affecte l'aptitude de blé au croisement avec *Hordeum bulbosum*. Elle peut modifier différenciellement le phénotype des variétés du blé classées croisables, alors que chez les variétés non croisables la température n'est pas en mesure de rendre ces variétés croisables car les facteurs génétiques inhibiteurs sont dominants. Dans le cas du phénotypage de *SKr*, nous avons réalisé les expériences de pollinisation systématique le matin entre 8h00 et 10h30 (avant que la température n'augmente dans la serre). D'autre part, les croisements interspécifiques demandent une bonne expérience de manipulation des plantes et de la conduite de l'expérimentation. Dans notre cas, le fait que plusieurs personnes aient été impliquées dans le test de l'aptitude, peut aussi être à l'origine de la variation. Pour réduire le risque de variation due à l'expérimentateur au minimum, au moins deux épis ont été castrés et pollinisés avec le seigle par lignée (voire un troisième et un quatrième si nécessaire).

Le classement que nous avons adopté (croisable et non croisable) est différent de celui décrit par LAMOUREUX (2002) sur la même population MP98 x Ct. LAMOUREUX (2002) avait défini une classification en 4 catégories basée principalement sur les valeurs d'aptitude obtenues pour le contrôle positif, Chinese Spring (CS). L'aptitude au croisement moyenne de CS (88 %) et l'écart-type (7,5 %) avaient servi pour définir la classe supérieure "croisable" à 88 ± 15 %, soit un intervalle de 73 à 100 %. Le témoin négatif Courtot non croisable (0 %) avait ensuite servi pour définir la classe non croisable de 0-15% après que le même écart type que celui observé avec CS lui ait été attribué. Le reste des valeurs observées chez les individus avait été divisé en deux classes égales, peu croisable de 16 à 44 % et moyennement croisable de 45 à 72 %. La classe non croisable que nous avons définie (0-10%) sur la base du phénotype de Courtot (0%) dans nos analyses et des observations précédentes à 10% de GAY and BERNARD (1994) et TIXIER *et al.* (1998) sur le même matériel est comparable. Par contre, nous avons basé notre classification pour le phénotype croisable sur la lignée MP98 le parent de la population MP98 x Ct et non pas sur Chinese Spring ce qui nous permet de mieux définir l'intervalle de confiance de cette classe dans ladite population. Enfin, au contraire de LAMOUREUX (2002) nous n'avons pas observé, ni confirmé d'individus présentant des valeurs d'aptitude au croisement comprises entre 16 et 40% et donc aucun individu de classe intermédiaire.

Quant aux locus mineurs à l'origine des légères variations observées, l'hypothèse la plus probable était un effet résiduel des autres gènes d'aptitude au croisement tels que *KrI*,

vraisemblablement présent mais détecté comme QTL mineur dans les populations HD Ct x CS (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002) et SSD MP98 x Ct (LAMOUREUX 2002). En 2002, les marqueurs disponibles pour évaluer l'effet de *Kr1* et *Kr2* sur les chromosomes 5B et 5A étaient en nombre limité et à l'époque l'analyse avait indiqué que MP98 portait l'allèle de Courtot au locus *Kr1*. Ainsi, seul l'effet de *SKr* sur l'aptitude au croisement pouvait être étudié dans la population de backcross MP98 x Ct. En caractérisant de nouveau les deux régions avec une plus grande densité de marqueurs, nous avons confirmé la présence du fond génétique de CS au locus *Kr2* mais également au locus *Kr1* ce qui implique que *Kr1* ségrège dans la population MP98 x Ct et qu'il peut potentiellement influencer sur les taux d'aptitude au croisement. Cependant, notre étude de corrélation ne montre aucun lien entre le phénotype et la composition allélique aux locus *Kr1* et *Kr2* suggérant ainsi que l'allèle *Kr1* de Courtot n'a qu'un effet très faible sur l'inhibition d'aptitude au croisement.

TIXIER *et al.* (1998) avaient fait l'hypothèse que Ct possède les allèles dominants *SKrSKr/Kr1Kr1* et l'allèle récessif *kr2kr2* pour expliquer le très faible taux d'aptitude au croisement (10%) et l'absence d'effet du locus *Kr2* dans l'analyse QTL. Nos résultats confirment la présence d'un allèle récessif de *Kr2* dans la population MP98 x Ct et suggèrent que Courtot possède soit un allèle *Kr1* de très faible effet difficile à détecter soit un allèle récessif. Cela expliquerait pourquoi *SKr* avait été identifié comme le QTL principal alors que *Kr1* était seulement détecté comme un QTL mineur (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002).

La question de l'effet relatif de *SKr* et *Kr1* est importante car jusqu'à nos études, toutes les analyses avaient indiqué que *Kr1* avait un effet majeur et supérieur à tous les autres gènes d'aptitude au croisement (JALANI and MOSS 1980; LANGE and RILEY 1973; LEIN 1943; RILEY and CHAPMAN 1967; SITCH *et al.* 1985; SNAPE *et al.* 1979). Cependant, ces gènes avaient été identifiés par analyse sur des lignées de délétion ou de substitution (LANGE and RILEY 1973; LEIN 1943; RILEY and CHAPMAN 1967; SITCH *et al.* 1985) et aucune étude n'avait été conduite par analyse de liaison ce qui rendait difficile la discrimination de l'effet des différents gènes, en particulier ceux localisés sur le même chromosome. RILEY and CHAPMAN (1967) ont montré à l'aide de lignées de substitutions que le chromosome 5B de Hope qui porte *Kr1* avait un effet inhibiteur plus fort que celui du 5A avec *Kr2*. Cependant, à l'époque, *SKr* n'avait pas été identifié et son effet potentiel n'avait pas pu être pris en compte. Nous ignorons si Hope porte l'allèle *SKr* et quelle est la part qu'il représente dans l'aptitude au croisement portée par le chromosome 5B dans cette variété. L'une des difficultés pour comparer les différentes études d'aptitude au croisement, même si ces études ont utilisé le même parent croisable

Chinese Spring, réside dans le fait qu'elles ont été menées avec des variétés non croisables différentes pour lesquelles la variation allélique aux locus *SKr* et *Kr* n'a pas pu être systématiquement évaluée. Il serait donc essentiel à l'avenir de pouvoir distinguer l'effet des différents gènes dans un même matériel en produisant par exemple des lignées di-télosomiques pour Courtot et Hope et en les comparant systématiquement. Les marqueurs liés à *SKr* que nous avons développés dans cette étude (cf. 3^{ème} partie) et ceux qui proviendront du travail de cartographie fine des autres locus *Kr* (*Kr1* en particulier qui est en cours d'analyse chez G. Moore (Comm. Person. JIC, UK)) seront très utiles pour mieux distinguer l'effet relatif des différents gènes sur l'aptitude au croisement du blé avec le seigle et l'effet relatif des différents allèles présents dans les parents non croisables.

Un projet de clonage positionnel chez le blé requiert la mise en place et l'analyse d'une population de cartographie génétique suffisamment large pour atteindre une résolution inférieure à 1-2 cM autour du gène cible et (2) la disponibilité des marqueurs flanquant le gène d'intérêt. Nos résultats de validation montrent que les marqueurs d'origine gpw1072 et dl103 ne sont finalement pas idéaux et que la sélection de recombinants a été biaisée. Néanmoins, la population de 50 SSD nous a permis d'identifier 8 nouveaux marqueurs, au locus *SKr*, tous en position proximale. L'objectif de la seconde partie du travail de thèse a donc été de développer de nouvelles populations de cartographie fine d'une part et de rajouter plus de marqueurs dans la région cible en particulier en région distale par l'exploitation des relations de synténie avec d'autres céréales.

**3^{ème} Partie : Cartographie Génétique Fine et
Initiation de la Cartographie Physique de la
Région de *SKr***

Tableau 9 : Marqueurs d'orge génétiquement cartographiés sur la partie distale du bras chromosomique 5HS (STEIN *et al.* 2007).

Nom du marqueur	Nom du clone	GenBank Acc. No.	Antibiotique	Nom du vecteur	Taille de l'insert (kb)*	Type d'insert
GBR1680	HB31H07r	BU975533	ampicilline	pBluescript SK+	0.80	ADNc
GBR0233	HW05F15u	AL501780	kanamycine	pBK-CMV	1.20	ADNc
GBR0210	HW05H15u	AL501817	kanamycine	pBK-CMV	0.70	ADNc
GBR0232	HW05D12u	AL501740	kanamycine	pBK-CMV	0.95	ADNc
GBS0577	HB09F23w	BQ658384	ampicilline	pBluescript SK+	0.70	ADNc
GBR0596	HW03I13T	AL503822	kanamycine	pBK-CMV	1.95	ADNc
GBR0271	HW01J07u	AL500703	kanamycine	pBK-CMV	2.00	ADNc
GBR1541	HB14L11r	BU970461	ampicilline	pBluescript SK+	0.90	ADNc
GBM1176	HU01M19w	BQ663268	ampicilline	pBluescript SK+	1.30	ADNc
GBR1565	HF25B22r	BU990459	ampicilline	pBluescript SK+	1.35	ADNc
GBM1173	HU01C15T	BQ464730	ampicilline	pBluescript SK+	2.10	ADNc
GBS0086	HY04P03T	AL507023	kanamycine	pBK-CMV	0.80	ADNc
GBS0412	HY06L08u	AL511010	kanamycine	pBK-CMV	1.45	ADNc
GBS0087	HY05I08u	AL510627	kanamycine	pBK-CMV	-	ADNc
GBR0618	HW05E06u	AL501754	kanamycine	pBK-CMV	1.20	ADNc
GBR0612	HW04P09u	AL501664	kanamycine	pBK-CMV	0.90	ADNc
GBS0629	HY04H14u	AL510286	kanamycine	pBK-CMV	1.30	ADNc
GBR0238	HW05O04u	AL501934	kanamycine	pBK-CMV	2.50	ADNc
mwg618	mwg618	AJ234539	ampicilline	Bluescript	3.00	génomique
ABC483	ABC483	L43957	ampicilline	pBS	1.10	ADNc
Mwg920	mwg920	AJ234647	ampicilline	Bluescript	1.00	génomique

* taille de l'insert obtenu dans notre laboratoire

I. Matériels et Méthodes

1. Exploitation des marqueurs ADNc

1.1. ESTs de blé (*Triticum aestivum* L.)

Dans le cadre d'un programme de cartographie d'EST de blé mené aux USA en 2004 (<http://wheat.pw.usda.gov/NSF>), 7104 contigs d'EST issus de 117,466 clones d'ADNc collectés de 43 banques différentes ont été assignés par RFLP aux 21 chromosomes de blé en utilisant 21 lignées nullisomiques-tétrasoniques, à leurs bras chromosomiques en utilisant 24 lignées di-télosomiques, et finalement à leurs bins de délétion en utilisant 101 lignées de délétion (QI *et al.* 2004). Parmi les 16,099 locus identifiés, 2555 ont été assignés sur les bins de délétion du groupe 5 (LINKIEWICZ *et al.* 2004) dont 50 dans le bin de délétion distal du chromosome 5B (5BS6-0.81-1.00, Figure18, http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi). Les séquences de ces ESTs ont été alignées contre les séquences ADNc d'orge (*cf.* 1.2) et contre les pseudo-molécules de riz (*cf.* 1.3) afin d'identifier les régions et séquences orthologues chez ces 2 espèces.

1.2. EST d'orge (*Hordeum vulgare* L.)

Une carte génétique intégrative d'orge comprenant 1030 marqueurs EST (STEIN *et al.* 2007) ainsi que 200 marqueurs cartographiés préalablement chez l'orge a été analysée afin d'identifier de nouveaux marqueurs potentiels pour le chromosome 5BS de blé. Au total, 117 marqueurs ont été cartographiés sur le chromosome 5H dont 18 EST et 3 RFLP (Tableau 9) sont localisés plus particulièrement dans la partie distale du bras court du chromosome 5H qui est orthologue de celle du chromosome 5BS de blé, la région cible portant le locus *SKr*.

Les 21 marqueurs d'orge ont été utilisés comme sondes RFLP. La mise en culture des clones, l'extraction d'ADN plasmidique, la purification de l'insert, l'hybridation sur membrane et la révélation sur film autoradiographique sont décrits dans le chapitre 1.4. Les tests de polymorphisme ont été réalisés sur les lignées parentales MP98 et Ct, ainsi que CS comme référence. La spécificité des marqueurs EST d'orge pour le chromosome 5B a été vérifiée en utilisant la lignée nullisomique-tétrasonique N5B/T5D et le bin de délétion distale 5BS6-0.81-1.00.

2. Alignement des séquences

Les séquences d'EST de blé (*cf. 1.1*) et d'orge (*cf. 1.2*) ainsi que les séquences obtenues pendant notre étude ont été comparées avec les séquences disponibles dans plusieurs bases de données publiques. Pour déterminer la région synténique chez le riz, l'alignement s'est fait contre les pseudomolécules du riz en utilisant la base de données publique de TIGR conçue pour l'annotation du génome du riz (Version 6, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Pour identifier des contigs de séquences codantes de blé établis à partir d'EST, l'alignement s'est fait en utilisant les bases de données de Graingenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml>) et de Génoplatte (<http://urgi.versailles.inra.fr/pise/blast2.html>). Des alignements de séquences d'intérêt (blé, orge et riz) ont également été réalisés contre la base de données générale de GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin d'identifier de nouvelles séquences (EST, BAC, CDS,...) pouvant servir à développer de nouveaux marqueurs. Les alignements ont été réalisés avec le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), et plus particulièrement à l'aide de l'outil d'alignement de nucléotide à nucléotide (BlastN).

3. Marqueurs SSR et ISBP

Les marqueurs SSR ont été amplifiés et révélés selon la méthode décrite en 2^{ème} Partie (*cf. 1.4.1*). Les marqueurs ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) ont été amplifiés dans les conditions suivantes : 3 µl d'ADN (10 ng/µl) ont été ajoutés à 1µl de Tampon 10X contenant 31mM de MgCl₂, 2 µl de solution Q 1X (Qiagen), 0.4 µl d'un mélange de dNTP 10 mM, 0.25 µl de Taq Polymerase (Qiagen), 0.5 µl d'un mélange d'amorces droite et gauche (10 µM), 1 µl de Syber green 1.6X et 1.85 µl d'H₂O dans un volume final de 10µl. L'amplification est réalisée dans un thermo-cycler (MJ Research PTC-225) en utilisant le programme « touchdown » suivant : 7 cycles (30s à 95°C, 30s à 62°C moins 1°C à chaque cycle, 30s à 72°C), 31 cycles (30s à 95°C, 30s à 55°C, 30s à 72°C) et 11 cycles additionnels (30s à 95°C, 30s à 56°C, 30s à 72°C). Les produits d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose 4%.

4. Criblage de la banque BAC de Chinese Spring

4.1. Criblage par PCR

Des pools représentant 4X de couverture de la banque de clones BAC de la variété Chinese Spring (*Triticum aestivum* L.) (ALLOUIS *et al.* 2003) http://cnrgv.toulouse.inra.fr/en/library/genomic_resource/Tae-B-Chinese%20spring) ont été criblés par PCR à l'aide

des marqueurs ATPase1-5B, cfb306 et cfb309. Les amorces du marqueur ATPase1-5B (F-5'CAGTGCCGTGCTTACCAGC'3 et R-5'AGCGTGTGCCCCACTTGAGCT'3) ont été dérivées de la séquence du contig d'ESTs CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024 (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpSeq/>) correspondant au gène *plasma membrane ATPase1* / et au marqueur EST GBR0233. Les marqueurs SSR cfb306 (F-5'TAAAGCGGATGGGTCTT GTT'3 et R-5'ATAAGATTACCTCGGGTGAA'3) et cfb309 (F-5'TAGGGCATATTTCC AACACT'3 et R-5'TAAGTCCGCGTATTAGCATT'3) ont été dérivés de la séquence du clone BAC 1793L02 de la variété Renan (*Triticum aestivum* var. Renan), ultérieurement nommé 1793L02-Re, disponible à GenBank sous l'accension CT009585 (CHANTRET *et al.* 2005).

Pour le marqueur ATPase1-5B, la réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 10µl contenant 4µl de l'ADN des pools de BAC ajoutés à un mélange contenant 2µl de tampon 10X, 0,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,05 µl (5u/µl) de GoTaq Flexi DNA polymérase (Promega), 0,2 µl de mélange de dNTPs 10 mM, 0,125 µl de chaque amorce (10 µM) et 3µl d'H₂O. L'amplification par PCR a été réalisée avec 40 cycles de 30s à 95°C, 45s à 65°C et 1 mn 30s à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 mn à 72°C.

Pour les marqueurs SSR cfb306 et cfb309, la réaction de PCR a été réalisée avec le kit LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science) dans un volume final de 10µl contenant 4µl de l'ADN des pools de BAC, 5 µl de pré-mix SYBR2X, 0,125 µl de chaque amorce et 0,75 µl d'H₂O. L'amplification par PCR a été réalisée avec 40 cycles de 20s à 95°C, 20s à 55°C (pour cfb306), et 65°C (pour cfb309), et 20s à 72°C suivi par une élongation finale de 5 mn à 72°C.

4.2. Criblage par hybridation

Quatre sondes, ATPase1-5B, SG317L24P2-E01, BGGP1 et Ha2 ont été utilisées pour un criblage des filtres nylon haute densité de la banque BAC Chinese Spring représentant une couverture de 4X. La sonde ATPase1-5B correspond au gène *plasma membrane ATPase1* (dont les amorces ont également été utilisées pour le criblage PCR, *cf.* 2.1) et la sonde SG317L24P2-E01 correspond au gène *pentatricopeptide* localisé sur le clone BAC 317L24 identifié par l'ATPase1-5B lors du criblage par PCR. Les deux autres sondes, Ha2 (F-5'CACGTTCTGGGCCAAATTAC'3 et R-5'TGAAACATGCCGAACAGCTA'3) et BGGP1 (F-5'TCACTTGCACTGCCGCGGGT'3 et R-5'CAGCGTGGATGGCGCTGTCC'3)

correspondent à des séquences localisées en aval (Ha2) et en amont (BGGP1) de la séquence CT009585 du BAC clone 1793L02. Ces sondes sont physiquement proches des marqueurs SSR cfb309 et cfb306, respectivement.

Les sondes ATPase1-5B, Ha2 et BGGP1 ont été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur *pGEM-T Easy* (Promega) selon les instructions du fabricant (Promega, <http://www.promega.com/>). L'ADN plasmidique a été extrait en petite quantité (miniprep) par lyse bactérienne alcaline selon les instructions du fabricant (QIAGEN Plasmid mini Kit, Hilden, Germany). Les inserts ont ensuite été isolés par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* ou amplifiés à l'aide des amorces SP6 (5'ATTTAGGTGACACTATAGAA3') et T7 (5'TAATA CGACTCACTATAGGG3'). L'insert isolé a été finalement purifié sur gel d'agarose avec le kit "GFX PCR and Gel purification Kit" (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) selon les instructions du fabricant. La sonde SG317L24P2-E01 provient d'un des sous-clones dans la banque construite pour le séquençage shotgun du clone BAC 317L24 pour laquelle les fragments ont été clonés dans le vecteur *pCR-Blunt-II-TOPO* (cf. 5.2).

5. Construction et séquençage d'une banque shotgun à partir d'un clone BAC

5.1. Extraction d'ADN des clones BAC

La mise en culture des clones BAC a été réalisée par étalement sur boîte de Pétri en milieu solide (14g d'agar / 1L LB Broth (Luria Bertani Broth)) contenant du Chloramphénicol (12,5 µg/ml). Après une nuit d'incubation à 37°C, un clone unique a été utilisé pour inoculer 50 ml de milieu liquide LB + 50 µl Chloremphenicol. Après une nuit à 37°C dans une étuve bactériologique sous agitation (250 RPM), l'ADN du BAC a été extrait par lyse bactérienne alcaline selon les instructions du fabricant (QIAGEN® Plasmid Midi Kit).

5.2. Construction de la banque

200 µl d'ADN de BAC (contenant environ 15 µg d'ADN de BAC) ont été fragmentés mécaniquement à l'aide d'un Hydroshear, (Genemachines, THORSTENSON *et al.* 1998). Les fragments résultant ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 1%, puis les fragments entre 500 pb et 3 kb purifiés à l'aide du kit "GFX PCR and Gel purification Kit" (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) selon les instructions du fabricant. 2µl d'ADN purifié ont été ensuite utilisés pour une réaction de réparation des extrémités par un mélange T4 DNA

polymérase/DNA polymérase Klenow avant déphosphorylation puis ligation avec le vecteur pCR-Blunt-II-TOPO (protocole Invitrogen, Carlsbad, CA). La réaction de ligation est utilisée pour transformer des cellules d'*E. coli* (souche TOP 10) électro-compétentes, puis les cellules transformées ont été sélectionnées sur un milieu solide contenant 50µg/ml de Kanamycine. Au total, 192 sous-clones (pour le clone BAC 317L24) et 288 sous-clones (pour le clone BAC 2163O14) ont été repiqués pour analyse ultérieure.

5.3. Séquençage partiel des clones BAC et assemblage

Un séquençage partiel (shotgun) de deux BACs 317L24 (65 kb) et 2163O14 (165 kb) a été réalisé par la société GATC Biotech (www.gatc-biotech.com) sur séquenceur automatique ABI3730XL. Les sous-clones ont été séquencés aux deux extrémités avec les amorces SP6 (5'ATTTAGGTGACACTATAGAA'3) et T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG'3) et les séquences ont été assemblées en utilisant le programme Pred/Phrap/Consed (EWING and GREEN 1998; EWING *et al.* 1998). Les séquences du vecteur ont été éliminées en utilisant CROSS_MATCH et les séquences d'*E. coli* ont été masquées par comparaison des séquences avec la séquence de la souche *E. coli* K12 (# U00096).

Tableau 10 : Relation de colinéarité entre 50 ESTs physiquement assignées sur le bin de délétion 5BS6-0.81-1.00 du 5BS et le riz. Les EST pour lesquelles aucune homologie n'a été trouvée sont indiquées en fin de tableau par "-".

EST de blé	Chr. de riz	Gène TIGR	Annotation TIGR V6
BE404135	1	<i>Os01g27210</i>	<i>glutathione S-transferase</i>
BE591279	1	<i>Os01g50690</i>	<i>WD domain, G-beta repeat</i>
BG263064	1	<i>Os01g58590</i>	<i>expressed protein</i>
BG314328	1	<i>Os01g01390</i>	<i>expressed protein</i>
BE399994	2	<i>Os02g56840</i>	<i>OsFBX70</i>
BE444854	2	<i>Os02g05030</i>	<i>sucrose-phosphatase</i>
BE499835	2	<i>Os02g33080</i>	<i>N-carbamoylputrescine amidase</i>
BE515435	2	<i>Os02g05310</i>	<i>splicing factor 3B subunit 1</i>
BG262914	3	<i>Os03g56790</i>	<i>actin-depolymerizing factor,</i>
BE636953	3	<i>Os03g61360</i>	<i>hydrolase, alpha/beta fold family</i>
BQ161441	3	<i>Os03g44530</i>	<i>GTPase of unknown function</i>
BF483193	4	<i>Os04g41040</i>	<i>DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1</i>
BF200555	6	<i>Os06g22020</i>	<i>cytochrome P450</i>
BF474459	8	<i>Os08g02130</i>	<i>RNA recognition motif</i>
BE499622	8	<i>Os08g43360</i>	<i>RNA recognition motif</i>
BF474459	8	<i>Os08g43361</i>	<i>RNA recognition motif</i>
BF482399	8	<i>Os08g15170</i>	<i>ATP synthase epsilon chain, mitochondrial</i>
BQ168258	10	<i>Os10g08550</i>	<i>enolase</i>
BF473571	3	<i>Os03g14450</i>	<i>enolase</i>
BE404594			
BE490728	12	<i>Os12g37260</i>	<i>lipoxygenase 2.1, chloroplast precursor</i>
BE636954	12	<i>Os12g44150</i>	<i>plasma membrane ATPase</i>
BE404603	12	<i>Os12g44340</i>	<i>ATMAP70</i>
BE443751	12	<i>Os12g37939</i>	<i>unc-93 homolog A</i>
BE443842	12	<i>Os12g42370</i>	<i>GTPase of unknown function</i>
BE591734	12	<i>Os12g42300</i>	<i>potassium efflux antiporter</i>
BE606535	12	<i>Os12g43550</i>	<i>ras-related protein</i>
BE606637	12	<i>Os12g44150</i>	<i>plasma membrane ATPase</i>
BF146054	12	<i>Os12g42550</i>	<i>methyl-CpG binding</i>
BF201102	12	<i>Os12g42876</i>	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase,</i>
BF201852	12	<i>Os12g42876</i>	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase,</i>
BF293016	12	<i>Os12g44230</i>	<i>expressed protein</i>
BF474606	12	<i>Os12g43950</i>	<i>homeobox</i>
BF485351	12	<i>Os12g42430</i>	<i>IQ calmodulin-binding motif</i>
BG607757	12	<i>Os12g42970</i>	<i>GATA zinc finger</i>
BE443842	12	<i>Os12g42370</i>	<i>GTPase of unknown function</i>
CD453257	12	<i>Os12g44150</i>	<i>plasma membrane ATPase</i>
BE426206	-	-	-
BG312568	-	-	-
BG604620	-	-	-
BM138487	-	-	-
BQ294679	-	-	-
BE446811	-	-	-
BE494952	-	-	-
BE496898	-	-	-
BG263797	-	-	-
BE637485	-	-	-
BE403857	-	-	-
BE499184	-	-	-
BF292905	-	-	-

II. Résultats

1. Exploitation des relations synténiques avec l'orge et le riz

1.1. Des relations synténiques complexes entre la partie distale du chromosome 5BS et le riz

Le riz, espèce modèle chez les céréales avec un génome complètement séquencé (GOFF *et al.* 2002; YU *et al.* 2002), représentait une source additionnelle de nouveaux marqueurs pour augmenter la résolution de la carte génétique dans la région du gène *SKr*. Afin de déterminer les relations de colinéarité entre la région de *SKr* et le riz, les séquences de 50 ESTs assignés physiquement au bin de délétion distal 5BS6-0.81-1.00 (LINKIEWICZ *et al.* 2004) ont été alignées (BlastN) avec les pseudomolécules du riz (TIGR, V6). Les résultats ont montré des relations de colinéarité complexes avec 8 des 12 chromosomes du riz et une majorité avec le chromosome 12 (Tableau 10) ce qui confirme les observations de LINKIEWICZ *et al.* (2004) et SORRELLS *et al.* (2003) pour le bras court du groupe 5 du blé. Cependant, les ESTs n'étant pas ordonnées à l'intérieur du bin et aucune EST n'ayant été cartographiée génétiquement, il n'était pas possible à ce stade de déterminer quelle était la relation synténique la plus pertinente pour la région du gène *SKr*.

1.2. Cartographie des marqueurs EST d'orge

1.2.1. Le chromosome 5HS, une bonne source de marqueurs pour le locus *SKr*

Afin de pallier le manque de précision sur la colinéarité avec le riz, nous avons étudié la possibilité d'utiliser les données de l'orge, en particulier une carte génétique récemment construite à partir de transcrits. Nous avons pu obtenir une carte de la partie distale du chromosome 5HS avant sa publication par l'intermédiaire d'une collaboration avec N. Stein (IPK Gatersleben) et avons reçu 21 marqueurs (18 EST + 3 RFLP) (Tableau 11, Figure 26A) que nous avons utilisés comme sondes RFLP.

Dans un premier temps, la spécificité des marqueurs d'orge du 5HS pour le chromosome 5BS a été vérifiée en utilisant la lignée nullisomique 5B/tétrasonique 5D (N5B/T5D) et la lignée de délétion 5BS6-0.81-1.00. Parmi les 21 marqueurs RFLP, 4 (MWG618, ABC483, GBS0086, GBR0612, Tableau 11) n'ont pas révélé d'hybridation spécifique sur les Southern blots. Parmi les 17 marqueurs montrant des bandes assignables, 12

Tableau 11 : Relations synténiques entre orge, blé et riz pour 21 marqueurs d'orge (18 ESTs + 3 RFLPs). Les gènes du riz sont nommés d'après leur annotation dans la base de données du TIGR (V6). La troisième colonne fournit les résultats de l'assignation des marqueurs au bin de délétion distal 5BS6-0.81-1.00 du blé (cv. Chinese Spring). NS : marqueur non assigné à 5BS6 par manque de spécificité. (-) : marqueur ne révélant pas d'hybridation spécifique sur les blots. Les colonnes 5 et 6 fournissent les numéros d'accèsion d'ESTs montrant respectivement de l'homologie avec les marqueurs d'orge et leur assignation au bin de délétion du blé (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/contig.cgi>) (Qi *et al.* 2004).

Nom du marqueur	GenBank acc. No.	Assignation 5BS6	Barley1 GeneChip Assembly	EST assigné au bin de délétion	Bin de délétion (assignation de NSF)	Contig d'ESTs de blé	Gènes de riz	Chr. de riz	Annotation (TIGR version 6)
GBR1680	BU975533	NS	-	-	-	-	No hit found	-	-
GBR0233	AL501780	5BS6	Barley1_00388	BE636954 BE606637	5AS3, 5BS6, 5DS3 5AS3, 5BS6, 5DS3, 4AL13	Contig17621	LOC_Os12g44150 LOC_Os03g48310	12, 3	Plasma membrane ATPase 1
GBR0210	AL501817	NS	Barley1_01310	BE403397	6AL4, 6BL5, 2DL3, C-2AL1	Contig16328	LOC_Os02g44080 LOC_Os06g22960	2,6	Aquaporin protein
GBR0232	AL501740	5BS6	Barley1_04876	-	-	-	LOC_Os01g55030	1	DNA-binding protein-related
GBS0577	BQ658384	NS	Barley1_00224	-	-	-	No hit found	-	-
GBR0596	AL503822	5BS6	Barley1_02724	BE405667 BE444854	5DS2 5AS3, 5BS6, 5DS2	Contig17756 Contig14227	LOC_Os02g05030 LOC_Os01g27880	2,1	Sucrose-phosphatase
GBR0271	AL500703	5BS6	Barley1_01294	BF473571	5AS3, 5BS6	Contig18467	LOC_Os03g14450 LOC_Os10g08550	3,10	Enolase 2
GBR1541	BU970461	5BS6	Barley1_01300	BF473571	5AS3, 5BS6	Contig18467	LOC_Os03g14450 LOC_Os10g08550	3,10	Enolase 2
MWG618	-	-	-	-	-	-	No hit found	-	-
ABC483	L43957	-	-	-	-	-	-	-	-
MWG920	-	5BS6	-	-	-	-	No hit found	-	-
GBM1176	BQ663268	5BS6	Barley1_07106	BQ294679	5AS3, 5BS6, 5DS	-	LOC_Os12g39070 LOC_Os03g45410	12,3	TATA-binding protein
GBR1565	BU990459	5BS6	Barley1_07106	BQ294679	5AS3, 5BS6, 5DS	-	LOC_Os12g39070 LOC_Os03g45410	12,3	TATA-binding protein
GBM1173	BQ464730	5BS6	-	-	-	-	LOC_Os03g58810	3	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase
GBS0086	AL507023	-	Barley1_06889	-	-	-	LOC_Os03g57420	3	ML domain protein
GBS0412	AL511010	5BS6	Barley1_01291	-	-	-	LOC_Os12g42980 LOC_Os03g14450	12,3	Cysteine synthase
GBS0087	AL510627	5BS6	Barley1_01424	BF201102	5AS3, 5BS6, 5DS	Contig18820	LOC_Os12g42876 LOC_Os12g42884	12	5-ethyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase
GBR0618	AL501754	NS	Barley1_02442	BF200528 BE399897	C-2AL1, C-2DL3 5AL1-5BL1-5DL1	Contig18008	LOC_Os09g27830	9	OsPDIL2-3
GBR0612	AL501664	-	Barley1_13572	-	-	-	LOC_Os06g45060	6	Expressed protein
GBS0629	AL510286	NS	Barley1_48309	BG314194	5DS2	Contig14123	No hit found	-	-
GBR0238	AL501934	5BS6	Barley1_01424	BF201102	5AS3, 5BS6, 5DS	Contig18820	LOC_Os12g42876 LOC_Os12g42884	12	5-ethyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase

ont révélé des locus spécifiques pour le bin de délétion distal 5BS6-0.81-1.00 (Tableau 11). Deux d'entre eux, GBR0233 et GBR1541 (GenBank # AL501780 et BU970461, respectivement) se sont révélés polymorphes entre les deux parents MP98 et Ct et ont été cartographiés sur les 50 SSDs de la population recombinante. GBR1541 a été cartographié du côté proximal de *SKr*, proche du marqueur RFLP *fbp276* alors que GBR0233 a été cartographié à l'extrémité du bras chromosomique 5BS du côté distal et très proche de *SKr* (Figure 26B).

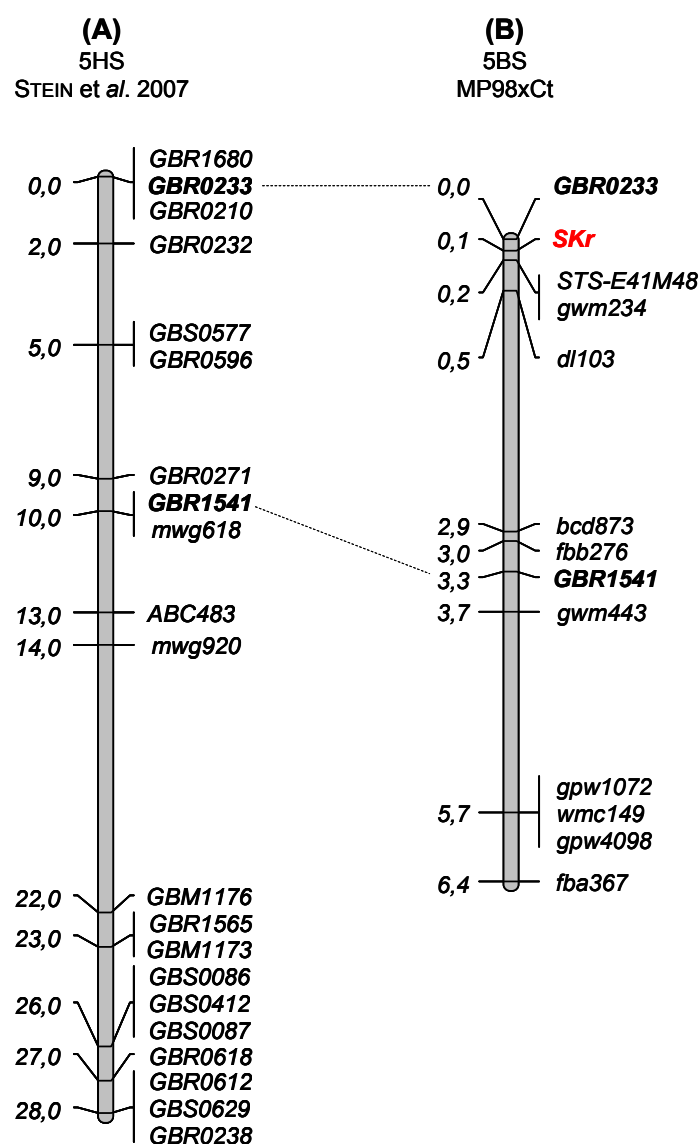


Figure 26 : Cartes génétiques et relations synténiques entre les parties distales des chromosomes 5BS de blé et 5HS d'orge. (A) : carte génétique du chromosome 5HS d'orge (STEIN *et al.* 2007). (B) : carte génétique du chromosome 5BS de blé (MP98 x Ct).

L'alignement de la séquence de GBR0233 contre la base de données d'EST assignés physiquement aux bins de délétion (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml>) a identifié une

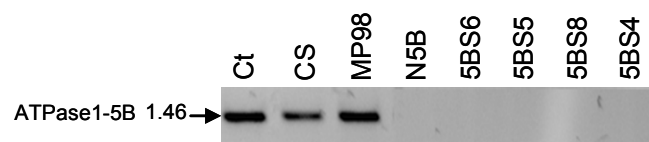


Figure 27 : Assignment du marqueur ATPase1-5B. Le marqueur a été amplifié par PCR sur Chinese Spring (CS) comme référence, sur la lignée nullisomique 5B – tétrasomique 5D (N5B/T5D) et les lignées de délétion 5BS6-0.81-1.00 (5BS6); 5BS5-0.71-0.81 (5BS5); 5BS8-0.56-0.71 (5BS8) et 5BS4-0.43-0.56 (5BS4). Les deux parents MP98 et Courtot ont été analysés pour le polymorphisme. L'analyse du produit PCR a été réalisée après électrophorèse sur gel d'agarose 2% et coloration au bromure d'Ethidium.

EST (GenBank # BE606637 ; E-Value 3e-69, score de 258 pb) localisée dans le bin distal (5BS6-0.81-1.00) du bras chromosomique 5BS (Tableau 11). De façon remarquable, l'EST BE606637 était aussi incluse dans un contig d'EST plus large (NSFT03P2_Contig17621) de 2308 pb contenant une autre EST (BE636954) assignée elle aussi au bin distal (5BS6-0.81-1.00) (Tableau 11). Ainsi, ces résultats confirment l'intérêt de l'utilisation de l'orge comme intermédiaire pour la cartographie génétique chez le blé en nous fournissant pour la première fois, un marqueur très proche de *SKr* et du côté distal (Figure 26B).

1.2.2. Tentative de conversion de GBR0233 en marqueur PCR

Afin de convertir le marqueur RFLP GBR0233 en marqueur exploitable en PCR pour une future cartographie génétique à haute densité, nous avons entrepris de rechercher dans les bases de données une séquence d'ADNc de blé correspondante la plus longue possible. Un contig d'EST (CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024) de 2707 pb montrant 97% d'identité (E-value 0.0) avec la séquence du contig NSFT03P2_Contig17621 a ainsi été identifié dans la base de données de Genoplate. Comme toutes les séquences unigène d'EST de blé, CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024 résulte d'un assemblage de plusieurs EST obtenues ici principalement à partir de la variété Récital (<http://urgi.versailles.inra.fr/pise/blast2.html>).

Chez le blé hexaploïde, les contigs d'EST correspondent généralement à une séquence consensus formée des trois copies homéologues A, B et D d'un gène. En comparant toutes les séquences du contig, nous avons pu distinguer 3 types de séquences et un SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) a été identifié entre les trois types. Une paire d'amorces spécifiques a été désignée pour chacune d'entre elles afin d'identifier la copie spécifique du 5B. La paire d'amorces F-5'CAGTGCCGTGCTTACCAGC'3 et R-5'AGCGTGTGCCCACTTGAGCT'3, a amplifié un produit de 1464 pb spécifique du chromosome 5B (nommé ATPase1-5B) comme le montre le test sur la lignée nulli-tétrasonique 5B (N5B/T5D) et les lignées de délétion de 5BS (Figure 27).

Des produits PCR de taille identique ont été amplifiés à partir des deux parents MP98 et Ct et de la lignée de référence CS (Figure 27). Ceux-ci ont été clonés dans le vecteur *pGEM-T Easy* (Promega) puis séquencés (GenBank # FJ666342 (CS), FJ805255 (Ct) et FJ805254 (MP98)). L'alignement des séquences a montré une identité de 100% entre les séquences issues de CS, Ct et MP98, même dans les régions introniques, ne permettant donc pas de développer un marqueur SNP pour le locus GBR0233.

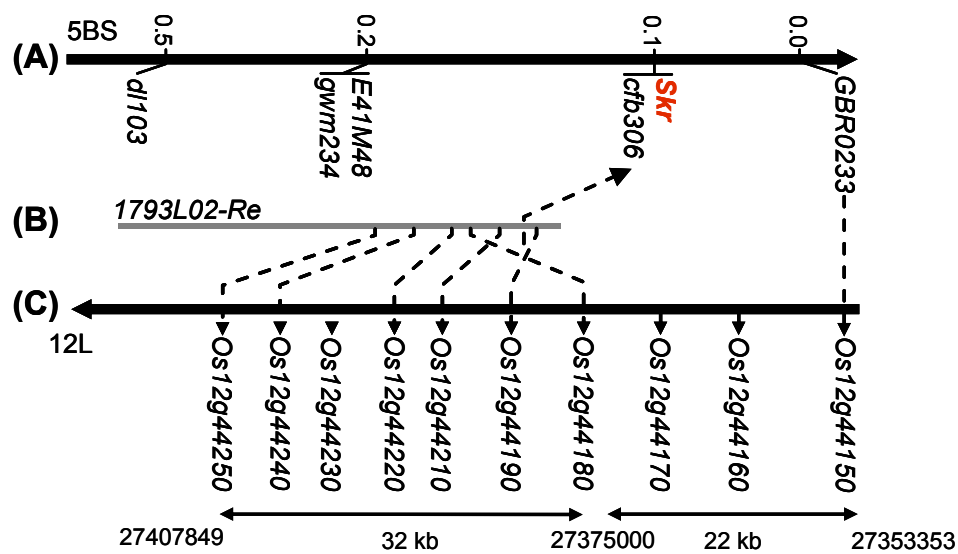


Figure 28 : Cartographie génétique des locus *SKr* et *GSP* sur la partie distale du bras chromosomique 5BS et micro-colinéarité avec le chromosome 12L de riz. (A) : Carte génétique de l'extrémité du chromosome 5BS dans la population MP98 x Ct. (B) : représentation schématique du clone BAC 1793L02 de la variété Renan (CHANTRET *et al.* 2005) portant le microsatellite *cfb306* complètement lié à *SKr*. (C) : représentation schématique de l'extrémité du chromosome 12L de riz portant 6 gènes conservés avec le clone BAC 1793L02 de *T. aestivum* var. Renan.

1.2.3. La région de *SKr* est synténique avec le chromosome 12 du riz

La comparaison de 21 séquences (EST et RFLP, Tableau 11) de l'orge avec les pseudomolécules de riz a identifié des gènes homéologues appartenant à 7 chromosomes de riz (1R, 2R, 3R, 6R, 9R, 10R et 12R) avec un tiers (6) d'entre eux appartenant au chromosome 12 (Tableau 11), ce qui rappelle la relation synténique complexe observée avec les 50 ESTs de blé (*cf. II.1.1*). Cependant, l'alignement du marqueur EST d'orge GBR0233, cartographié à proximité de *SKr* a identifié le gène orthologue (Os12g44150) annoté comme une "*plasma membrane ATPase1*" et localisé à l'extrémité du bras long du chromosome 12 (Figure 28). Ainsi, grâce à la cartographie du marqueur d'orge (GBR0233), la région synténique de riz a été plus précisément déterminée avec le chromosome 12L. Par contre, la séquence du riz orthologue du deuxième marqueur EST d'orge cartographié GBR1541 (Figure 26B) est annotée comme un gène *Enolase2* localisé sur les chromosomes 10 et 3 (Tableau 11) ce qui suggère une rupture de la synténie dans cette région sur la partie distale de 5BS.

En conclusion, l'exploitation d'une carte génétique d'orge construite à partir des transcrits n'a pas seulement conduit à cartographier un marqueur (GBR0233) très proche de *SKr*, mais nous a aussi permis d'établir une relation synténique entre la région de *SKr* et le chromosome 12L de riz. Cette étape importante, nous permet maintenant de nous concentrer sur le chromosome 12L pour rechercher de nouveaux marqueurs.

1.2.4. *SKr* est lié à au locus *GSP* « Grain Softness Protein »

L'analyse étendue de la région synténique de riz sur le chromosome 12L autour du gène *Os12g44150*, orthologue du marqueur EST d'orge GBR0233, a montré que *Os12g44150* est séparé seulement par deux gènes (Figure 28) d'un groupe de gènes (*Os12g44180* à *Os12g44250*) identifiés précédemment comme orthologues de la région portant le gène *GSP* (Grain Softness Protein) sur le bras court du groupe 5 du blé (CHANTRET *et al.* 2004; IGREJAS *et al.* 2002; SOURDILLE *et al.* 1996; TURNER *et al.* 1999) et sur le bras court du chromosome 5H d'orge (CALDWELL *et al.* 2004).

Afin de valider que le locus *GSP* est bien à proximité de *SKr* sur le chromosome 5B et pour dériver de nouveaux marqueurs, 17 marqueurs ISBPs (Insertion Site Based Polymorphism, PAUX *et al.* 2006) et 13 SSRs (*cf. annexe 2*) ont été désignés à partir de la séquence du BAC 1793L02 portant le locus *GSP* spécifique du chromosome 5B de la variété Renan (Figure 28) (# CT009585, CHANTRET *et al.* 2005). Parmi eux, cinq marqueurs SSR (cfb301, cfb302, cfb303, cfb306, et cfb309) et 9 marqueurs ISBP (cfp187, cfp188, cfp190,

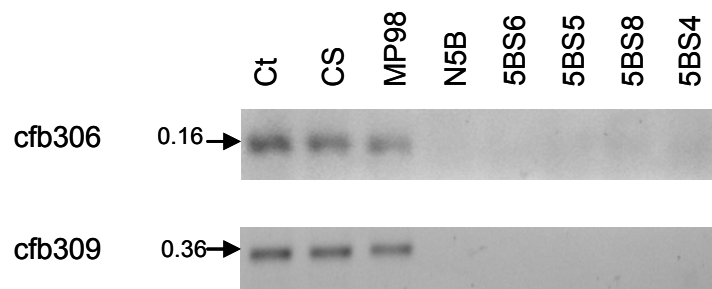


Figure 29 : Assignment des marqueurs SSR cfb306 et cfb309 au chromosome 5B et au bin de délétion distale.

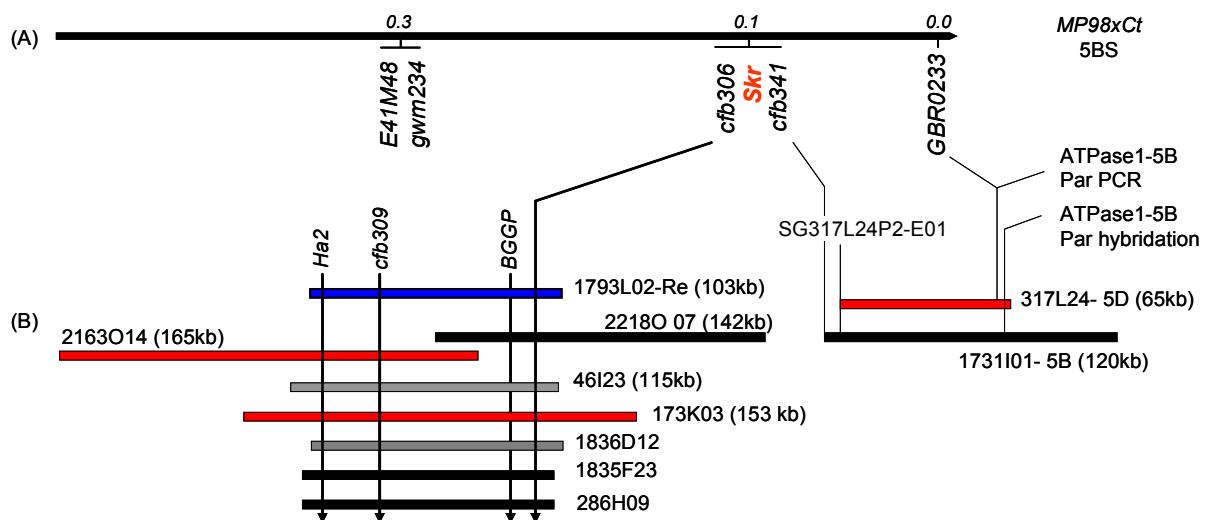


Figure 30 : Représentation schématique des clones BAC identifiés lors du criblage de la banque BAC de Chinese Spring par PCR et par hybridation. (A) : carte génétique de l'extrémité télomérique du chromosome 5BS. (B) : clones BAC identifiés au locus *Skr*. En bleu : le clone BAC 1793L02 de la variété Renan (GenBank Acc. CT009585). En rouge : les clones BAC identifiés par PCR. En noir : Les clones BAC identifiés par hybridation. En gris : Les clones BAC identifiés par les 2 approches.

cfp191, cfp192, cfp193, cfp194, cfp195, et cfp1005) étaient spécifiques du chromosome 5B et du bin de délétion 5BS6-0.81-1.00 (Figure 29). Seul le marqueur cfb306, a révélé du polymorphisme entre Ct et MP98 sur gel d'acrylamide 6%. Sa cartographie génétique à l'aide de la population des 50 SSDs recombinants montre une ségrégation complète avec *SKr* (Figure 28) indiquant ainsi une liaison très proche entre les locus *GSP* et *SKr* dans la partie distale du chromosome 5BS. Ils démontrent de plus un niveau élevé de micro-colinéarité entre la région des locus *SKr/GSP-5B* sur le bras chromosomique 5BS du blé et le chromosome 12L du riz (Figure 28) avec la conservation de 7 gènes en position orthologues. De façon remarquable cet intervalle représente une distance physique de seulement 54 kb chez le riz (Figure 28C) ce qui suggère une taille favorable à la poursuite du clonage positionnel du gène *SKr* chez le blé.

Enfin, le fait qu'un seul marqueur (cfb306) se soit révélé polymorphe parmi les 30 marqueurs dérivés de la séquence CT009585, et l'échec précédent de conversion du marqueur RFLP GBR0233 en marqueur PCR du fait des 100% d'identité entre les séquences des parents MP98 et Ct, suggèrent un taux de polymorphisme extrêmement faible dans la région de *SKr*.

2. Construction d'une carte physique au locus *SKr*

Pour initier la cartographie physique du locus *SKr* et établir un contig couvrant la région du gène, un criblage de la banque de clones BAC de Chinese Spring a été effectué en deux étapes.

2.1. Criblage de la banque CS par PCR

Dans un premier temps, des pools de la banque réalisés au CNRGV et correspondant à 4X de couverture ont été criblés par PCR. Le criblage a été réalisé au CNRGV à l'aide d'amorces correspondant aux séquences des marqueurs spécifiques ATPase1-5B (Figure 27), cfb306 et cfb309 (Figure 29).

Le marqueur cfb306 a identifié 3 clones BAC 46I23 (115 kb), 173K03 (153 kb) et 1836D12 (Figure 30), alors que le marqueur cfb309, dérivé de la même séquence BAC et localisé à 73,4 kb (22915-23277 pb) en aval du marqueur cfb306 (95670-95825 pb) a identifié 4 clones BAC. Trois d'entre eux (46I23, 173K03 et 1836D12) sont commun avec ceux identifiés par le marqueur cfb306 tandis que le 4^{ème} 2163O14 (165 kb) se situe en aval des trois autres (Figure 30). Le marqueur ATPase1-5B (Figure 27) correspondant au gène *plasma membrane ATPase1/* et au marqueur EST GBR0233 n'a permis d'identifier qu'un seul clone BAC 317L24 (65 kb) (Figure 30).

Tableau 12 : 44 clones BAC identifiés par criblage de la banque de clones BAC de Chinese Spring par hybridation avec un mélange de 4 sondes (Ha2, BGGP, SG317L24P2-E01 et ATPase1-5B).

N°	Nom du clone BAC	N°	Nom du clone BAC	N°	Nom du clone BAC	N°	Nom du clone BAC
1	22P24	12	252F17	23	453D03	34	1835F23
2	42N05	13	259J18	24	1728N06	35	1836D12
3	46I23	14	275H09	25	1731I01	36	1951C22
4	52F01	15	282J12	26	1744J03	37	1953O22
5	56L19	16	286G16	27	1749N14	38	1983H16
6	61D22	17	286H09	28	1764M11	39	2109L16
7	62D22	18	289L01	29	1807G15	40	2111B24
8	64A01	19	317L24	30	1820D18	41	2115L05
9	143L16	20	361O08	31	1826O06	42	2176J16
10	237D04	21	444N14	32	1832O10	43	2191A11
11	251F15	22	449M20	33	1833J22	44	2218O07

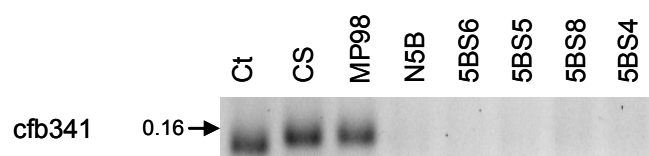


Figure 31: Assignment du marqueur cfb341 au chromosome 5B et aux bins de délétion sur 5BS.

Ainsi, un total de 5 clones BAC a été identifié par criblage PCR aboutissant à une carte encore partielle du locus. Afin de compléter cette carte et d'augmenter la couverture de criblage, un deuxième criblage a été entrepris au CNRGV par hybridation des filtres haute densité de la banque de CS qui représentent une couverture de 4X du génome.

2.2. Criblage de la banque CS par hybridation

Le criblage des filtres haute densité a été réalisé par hybridation simultanée de 4 sondes : Ha2, une sonde génomique localisée à 19,97 kb en aval du marqueur cfb309, (2) BGGP, une sonde qui correspond au gène *N-acetylglucosaminyltransferase* localisé à 16,71 kb en aval du marqueur cfb306, (3) SG317L24P2-E01, une sonde correspondant à la séquence partielle du gène *pentatricopeptide* (*cf.* ctg09, Tableau 13) identifié lors du séquençage partiel (shotgun) du clone BAC 317L24 identifié précédemment par PCR (*cf.* Figure 30 et 3.1 ci-dessous), (4) et la sonde ATPase1-5B, correspondant au gène *plasma membrane ATPase1* et au marqueur GBR0233, Figure 30). Au total, 44 clones BACs ont été identifiés (Tableau 12).

Ici, le criblage par hybridation ne permet pas d'être aussi spécifique que le criblage par PCR et il est probable que les 44 clones BAC correspondent à des clones issus du chromosome 5B dans la région du locus *SKr* mais aussi des régions homéologues des chromosomes 5A et 5D ou même d'autres locus qui peuvent être identifiés ailleurs par ces sondes sur le génome du blé.

L'identification des clones BAC spécifiques de 5B dans la région de *SKr* a été réalisée par analyse de l'ADN des 44 clones BAC par PCR avec les marqueurs spécifiques du chromosome 5B ATPase1-5B (Figure 27) cfb306, cfb309 (Figure 29) et cfb341 (Figure 31) (cfb341 est dérivé de la séquence du sous-clone SG317L24P2-E01, *cf.* 4.1 ci-dessous).

Grâce à ce criblage, 4 nouveaux clones BAC spécifiques du chromosome 5B ont pu être isolés. D'une part, les clones BAC 1835F23 et 286H09 identifiés par les deux marqueurs cfb306 et cfb309 et le clone BAC 2218O07 (142 kb) identifié uniquement par le marqueur cfb306 (Figure 30). Ce dernier BAC est donc chevauchant du côté amont du clone BAC de référence (1793L02 de la variété Renan). D'autre part, le clone BAC 1731I01 supplémentaire (120 kb) a été identifié par les marqueurs cfb341 et ATPase1-5B. Ce criblage nous a donc permis d'établir un contig de 300 kb du côté proximal de *SKr* et avons identifié un clone BAC (1731I01) de 120 kb du côté distal (Figure 30).

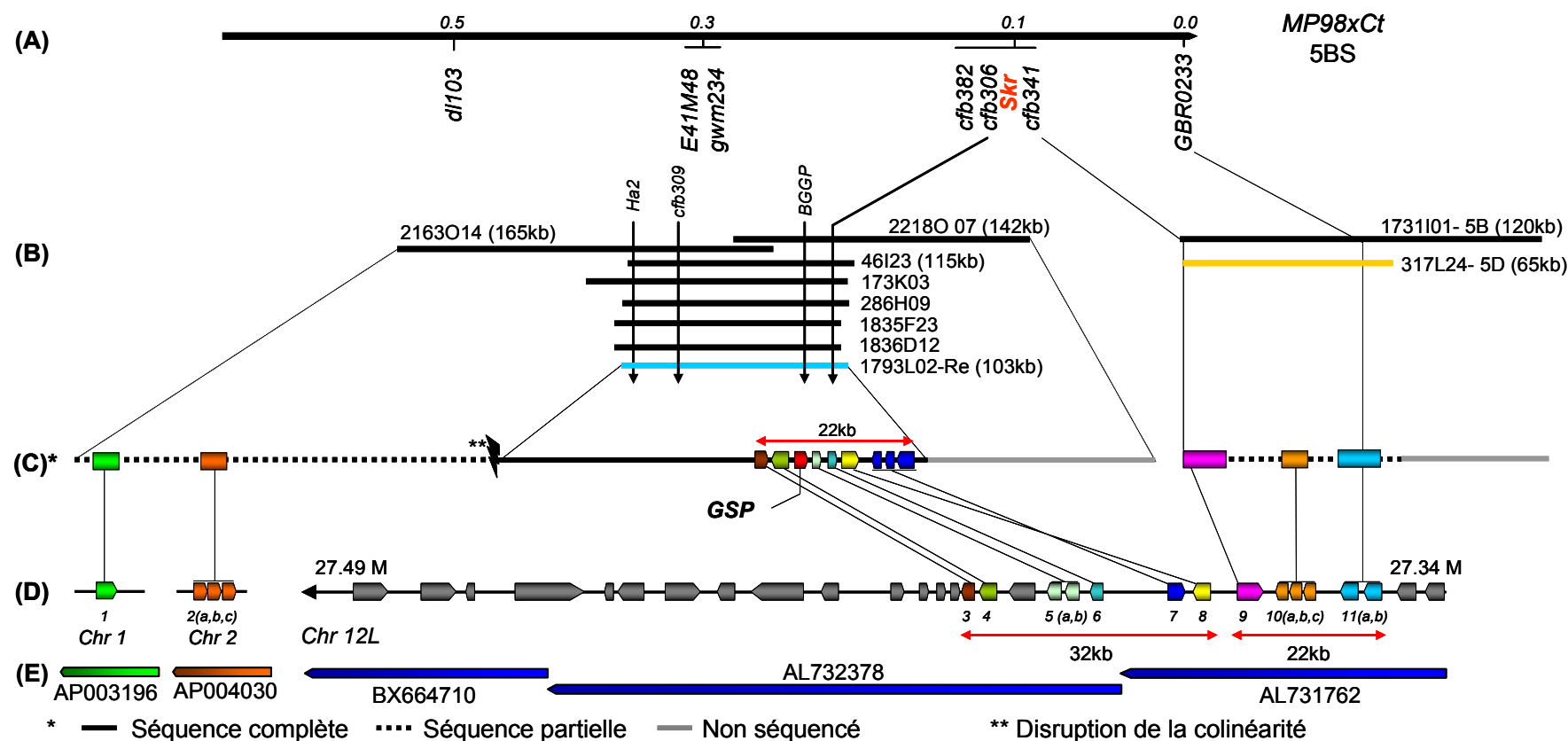


Figure 32 : Carte génétique et physique au locus *SKr* et relations synténiques avec le riz. (A) : Carte génétique du locus *SKr* sur le chromosome 5BS. (B) : Carte physique du locus *SKr*. (C) : Représentation détaillée des clones BACs identifiés au locus *GSP* (Grain Softness Protein) sur le chromosome 5B (1793L02 en bleu) (CHANTRET *et al.* 2005) et au locus *SKr*. L'ordre des gènes sur le BAC 317L24 (en orange) partiellement séquencé correspond à l'ordre établi sur la carte génétique pour *cfb341* et *GBR0233*. (D) : Colinéarité avec des gènes localisés sur les chromosomes 1, 2 et 12 du riz. (E) : Les clones BAC du riz associés avec les différents gènes orthologues du blé sur le chromosome 5BS. Les 11 gènes du riz sur les chromosomes 1, 2 et 12 du riz sont annotés comme suit: (1) *Os01g14180*: *expressed protein*; (2 a,b,c) *Os02g13990*: *U2 small nuclear ribonucleoprotein A (U2A)*; (3) *Os12g44250* : *vesicle-associated membrane protein*; (4) *Os12g44240* : *N-acetylglucosaminyltransferase*; (5 a,b) *Os12g44220* : *ATPase*; (6) *Os12g44210*: *ATPase, AAA family domain containing protein*; (7) *Os12g44190*: *ATPase 3*; (8) *Os12g44180*: *nodulin*; (9) *Os12g44170* : *pentatricopeptide* ; (10 a,b,c) *Os12g44160*: *oxidoreductase*; et (11 a,b) *Os12g44150*: *plasma membrane ATPase*. En gris les autres gènes présents à l'extrémité du chromosome 12L.

3. Séquençage partiel des clones BAC et développement de nouveaux marqueurs

Le séquençage partiel (shotgun) des clones BAC 317L24 et 2163O14 (Figure 30) a été réalisé afin de caractériser la relation synténique avec le riz et de développer de nouveaux marqueurs pour augmenter la résolution de la carte génétique dans la région de *SKr*.

3.1. Séquençage partiel du clone BAC 317L24

Le séquençage partiel du clone BAC 317L24 a été réalisé avec une couverture de séquence égal à 0,9X. Après assemblage de la séquence, 21 contigs et 14 singletons représentant 58467 pb de séquences ont été obtenus et comparés avec la séquence des pseudomolécules de riz (<http://rice.plantbiology.msu.edu/blast.shtml>, TIGR V6) en utilisant BlastN.

Trois contigs (Ctg19, Ctg20 et Ctg09, Tableau 13) ont été identifiés portant chacun la séquence partielle d'un gène. Le contig (Ctg19) porte le gène correspondant au marqueur EST GBR0233 et au gène orthologue de riz *Os12g44150* tandis que les contigs Ctg20 et Ctg09 portent respectivement les gènes orthologues des gènes de riz *Os12g44160* et *Os12g44170* (Tableau 13) qui sont, selon l'annotation du génome du riz, consécutifs au gène codant pour l'*ATPase1 Os12g44150* (Figure 32). Ainsi, le clone BAC 317L24 porte trois gènes orthologues à trois gènes de riz qui sont localisés immédiatement en amont des six gènes (*Os12g44180* à *Os12g44250*) précédemment identifiés comme orthologues à la copie homéologue 5B du locus *GSP* (Figure 32).

Ces résultats démontrent une très bonne relation de colinéarité entre neuf gènes sur le chromosome 12 du riz et la région des locus *SKr/GSP-5B* sur le chromosome 5BS. De plus, le fait que le BAC 317L24 et le contig incluant le BAC 1793L02-Re portent neuf gènes orthologues et consécutifs localisés dans un intervalle de 54 kb chez le riz (Figure 32), confirme que l'intervalle physique manquant sur le chromosome 5BS de blé n'est probablement pas très large (Figure 32).

3.2. Séquençage partiel du clone BAC 2163O14

Pour analyser la micro-colinéarité en amont du locus *GSP-5B* (Figure 32) et dériver de nouveaux marqueurs proximaux, nous avons réalisé un séquençage partiel du clone BAC 2163O14 avec une couverture de séquence égale à 0,73X. 88 contigs et 2 singletons représentant 122365 pb ont été obtenus et comparés avec les pseudomolécules de riz.

Tableau 13 : Analyse comparée des séquences génomiques partielles obtenues à partir des clones BAC 317L24 (Ctg : 19, 20 et 09) et 2163O14 (Ctg : 46 et 101) et de la séquence du génome de riz.

Nom de la séquence	Clone BAC	GenBank Acc. No.	Taille (bp)	Gene TIGR	chr. Riz	E-Value	Identité %	Annotation TIGR v.6
Ctg19	317L24	FJ666343	4484	Os12g44150	12	1.5e-255	70	plasma membrane ATPase1
Ctg20	317L24	FJ666341	7208	Os12g44160	12	8.0e-124	79	Oxidoreductase
Ctg09	317L24	FJ666346	1448	Os12g44170	12	5.7e-163	82	pentatricopeptide
Ctg46	2163O14	GQ219778	1293	Os01g14180	1	2.1e-11	76	expressed protein
Ctg101	2163O14	GQ219777	3091	Os02g13990	2	1.5e-40	66	U2 small nuclear ribonucleoprotein A

Tableau 14 : Alignement entre les contigs des séquences partielles (shotgun) du clone BAC 2163O14 partagées avec la séquence du clone BAC 1793L02 (CT009585) de la variété Renan.

Contig	Taille (pb)	SNP	Position sur CT009585		Contig	Taille (pb)	SNP	Position sur CT009585	
			Start	End				Start	End
Ctg7	609	1	1191	583	Ctg107	2860	3	34533	37392
Ctg93	2986	1	6383	3420	Ctg28	511	0	37936	37426
Ctg90	732	3	6696	7427	Ctg50	706	0	38595	39300
Ctg97	1551	0	9773	8223	Ctg121	2390	8	41772	44147
Ctg91	1591	0	11206	12797	Ctg78	1051	0	45770	44729
Ctg21	538	0	17641	17104	Ctg100	1431	1	47433	46003
Ctg56	601	0	17728	18328	Ctg88	1647	0	50095	48471
Ctg105	2833	2	18557	21389	Ctg110	1964	2	50313	52272
Ctg34	754	0	21483	22236	Ctg70	1219	3	55516	56735
Ctg31	1506	2	23776	22272	Ctg113	2046	1	59151	57106
Ctg54	793	0	24371	25161	Ctg71	736	0	61540	62258
Ctg111	1388	0	26848	25481	Ctg114	2769	0	67682	64914
Ctg89	1098	0	29814	28717	Ctg43	705	0	67714	68413
Ctg65	1087	1	31061	29990	Ctg94	2063	3	69394	71453
Ctg99	1702	6	34004	32304	Total	41740	37		

Les résultats ont montré que deux contigs, Ctg46 et Ctg101, portent des séquences partielles de deux gènes orthologues aux gènes de riz *Os01g14180* et *Os02g13990* localisés sur les chromosomes 1 et 2, respectivement (Tableau 13, Figure 32). Ces résultats démontrent une rupture complète de la micro-colinéarité entre les locus *SKr/GSP* sur 5BS et le chromosome 12L de riz à partir du gène (*Os02g13990*, *U2 small nuclear ribonucleoprotein A*, Figure 32) et en amont de celui-ci. Ils corroborent l'analyse précédente réalisée à l'échelle du bin de délétion distal avec les 50 ESTs de blé (*cf. II.1*). Cette rupture de colinéarité a pour conséquence de limiter, à partir de ce point, l'utilisation du chromosome 12 de riz comme source de nouveaux marqueurs pour la région de *SKr*.

Afin de déterminer le chevauchement entre les clones 2163O14 et 1793L02-Re (CT009585) (Figure 32), un séquençage des extrémités du BAC 2163O14 a été effectué avec les amorces T7 et M13rev par le CNRGV. Etrangement, aucune des séquences d'extrémités n'a révélé de similarité avec la séquence CT009585 du clone BAC 1793L02-Re. Cependant, l'alignement des séquences shotgun obtenues du BAC 2163O14 avec la séquence CT009585 du clone BAC 1793L02-Re a permis d'identifier les contigs de séquences partagées dans la région chevauchante (Figure 32, Tableau 14). Toutes les séquences partagées ont montré une très forte identité entre les deux BAC (issus de 2 variétés différentes), avec seulement 37 SNP détectés sur 41,74 kb (en moyenne 1 SNP tous les 1128 pb), ce qui confirme que le clone BAC 2163O14 est originaire du 5B et est chevauchant avec le BAC 1793L02-Re et qu'un problème est survenu durant le séquençage des BAC ends. Le point d'alignement le plus extrême identifié se situe entre la séquence du contig94 (Ctg94) de 2163O14 et la position (69394-71453 pb) de la séquence CT009585 (Tableau 14). Ces résultats indiquent que l'intervalle de chevauchement entre les deux BACs est de 72 kb environ avec une marge d'erreur approximative de 2,5 kb si l'on prend en compte que la séquence CT009585 du BAC 1793L02-Re inclus, tous les 10kb, 4 à 5 contigs de séquences provenant du BAC 2163O14 (Tableau 14).

4. Saturation de la région *SKr* avec de nouveaux marqueurs

4.1. Marqueurs dérivés du clone BAC 317L24

Un total de 10 marqueurs ISBP et 26 marqueurs SSR ont été désignés à partir de la séquence partielle du clone BAC 317L24 situé en aval de *SKr* (*cf. Annexe 3*). Un seul marqueur nommé cfb331 (F-5'TAATTAGGGCCTGCTTCTGCT3' et R-5'CAGATGCTTCCTTCATCCAAA3') dérivé de la séquence du Ctg09 (Tableau 13) a montré du

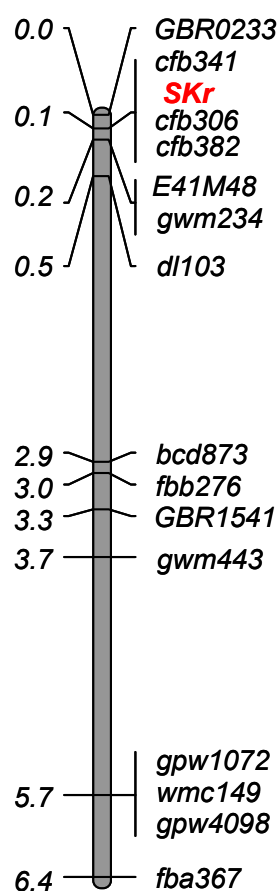


Figure 33 : Carte génétique de la partie distale du chromosome 5BS de la population MP98 x Ct après densification par de nouveaux marqueurs.

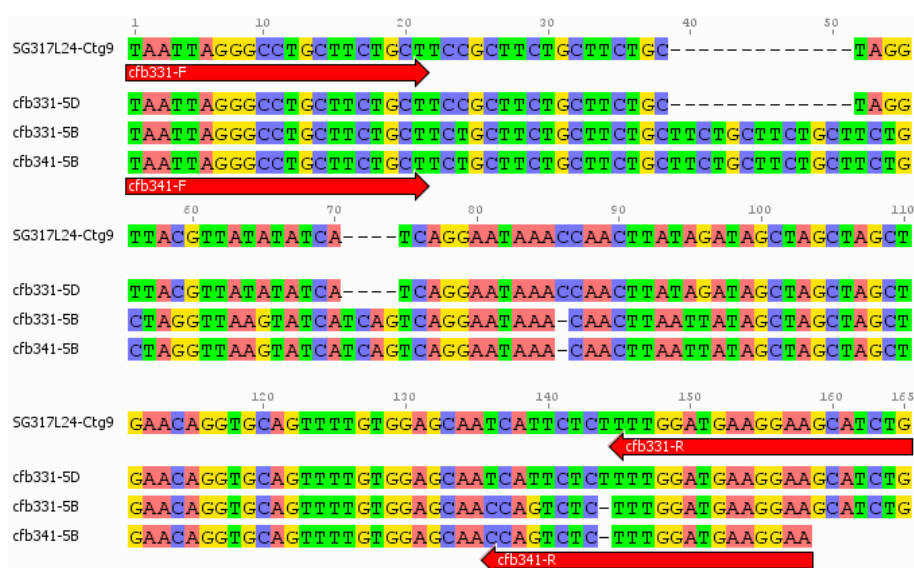


Figure 34 : Alignement entre la séquence du contig Ctg9 issu du clone BAC 317L24 et les deux locus cfb331-5D et cfb331-5B. Une identité de 100% est observée entre le Ctg9 et le locus cfb331-5D indiquant que le clone BAC 317L24 est en fait originaire du chromosome 5D. Le marqueur cfb341 spécifique uniquement du 5B a été désigné en utilisant les SNP identifiés entre les deux séquences.

polymorphisme sur gel d'acrylamide 6% entre les parents MP98 et Ct. Ce marqueur a révélé deux fragments (cfb331-5B et cfb331-5D) qui ont été assignés aux chromosomes 5B et 5D en utilisant les lignées nulli-tétrasoniques N5B/T5D et N5D/T5A. Le locus spécifique du 5B a été cartographié en complète liaison avec le gène *SKr* (Figures 32 et 33). Les deux fragments (cfb331-5B et cfb331-5D) ont été clonés dans le vecteur *pGEM-T Easy* (Promega) et ont été séquencés (GenBank # FJ666344 (cfb331-5B) et FJ666345 (cfb331-5D)). Les résultats ont montré que cfb331-5D est complètement identique à la séquence shotgun du Ctg09 (Tableau 13) duquel il est originaire tandis que plusieurs SNPs ont été trouvés avec la séquence cfb331-5B (Figure 34).

Ce résultat démontre qu'en réalité le clone BAC 317L24 est originaire du chromosome 5D et non pas du chromosome 5B. Il semble que la spécificité du marqueur PCR ATPase1-5B qui est basé sur un seul SNP n'ait pas été suffisante pour assurer une spécificité lors du criblage des pools de la banque par PCR. Cela pourrait être dû au plus grand nombre de molécules présentes dans les pools de BAC par rapport à de l'ADN génomique et le fait qu'un seul SNP pourtant placé en position 3' entre la copie du 5B et du 5D ne soit pas assez résolutif dans ces conditions. Ainsi, le clone BAC 317L24 ne peut pas être lié au contig physique de la région de *SKr* sur le chromosome 5B (Figure 32). Le séquençage partiel du BAC 317L02 identifié lors du criblage de la banque de clones BAC de Chinese Spring par PCR avait été réalisé avant que l'autre BAC, 1731I01 ne soit identifié par hybridation. La spécificité de 1731I01 pour le chromosome 5B a été quant à elle validée par le séquençage de deux extrémités du clone BAC. Le résultat de séquençage a montré que l'une de deux extrémités séquencées porte le locus cfb331-5B avec une identité de 100%. Ce BAC issu du chromosome 5B pourra donc être exploité pour dériver de nouveaux marqueurs.

Le locus cfb331-5B était difficile à exploiter directement parce que l'allèle de Ct à ce locus était d'une taille très similaire à celle du locus 5D (cfb331-5D) ce qui pouvait provoquer une ambiguïté lors des analyses de liaisons. Pour éviter cette ambiguïté, nous avons exploité la comparaison de la séquence entre les deux séquences des marqueurs cfb331-5B et cfb331-5D pour désigner un marqueur spécifique du 5B, renommé cfb341 (F-5'TAATTAGGGCCTGCTTCTGCT3' et R-5'TTCCTTCATCCAAAGA GACTGG3') (Figure 34). Le marqueur SSR cfb341 est localisé dans un gène (ctg09, Tableau 13) montrant de l'homologie avec le gène *pentatricopeptide* (*Os12g44170*) de riz (Figure 32, Tableau 13). Ainsi, nos résultats montrent que les deux marqueurs (GBR0233 et cfb341) correspondant aux deux gènes *plasma membrane ATPase1* et *pentatricopeptide* (séparés seulement par 6 kb sur le chromosome 12 de riz) sont présents sur un BAC unique (317L24) et sont séparés

au moins par un événement de recombinaison sur le chromosome 5BS (Figure 32 et 33). Ceci suggère des taux de recombinaison élevés dans la région de *SKr* et un ratio entre distance génétique et distance physique favorable à l'isolement du gène *SKr* par clonage positionnel.

4.2. Marqueurs dérivés du clone BAC 2163O14

Le clone BAC 2163O14 (165 kb) chevauche d'environ 72 kb le BAC 1793L02-Re (103 kb) que nous avons précédemment exploité pour dériver des marqueurs. De nouveaux marqueurs ont été définis à partir des séquences partielles issues de la partie non chevauchante (~90 kb) en amont du contig. Un total de 20 marqueurs ISBP et 25 marqueurs SSR ont été désignés (*cf.* Annexe 4). Un seul SSR (cfb362) et 7 ISBPs (cfp4013, cfp4015, cfp4016, cfp4018, cfp4019, cfp4021 et cfp4026) se sont révélés spécifiques du bin de délétion distale 5BS6 mais aucun d'entre eux ne s'est révélé polymorphe entre les parents de la population MP98 et Ct. La disponibilité d'une banque de clones BAC de la variété Ct (le parent non croisable) à l'avenir (collaboration avec le CNRGV) permettra peut être de pallier ce manque de polymorphisme.

La comparaison des contigs de séquences issus de la partie de 72 kb chevauchante avec le BAC 1793L02-Re a montré un taux de conservation étonnamment fort entre les deux BACs issus de variétés différentes. Une seule région a montré une différence de séquence entre le contig94 (2063 pb) du BAC 2163O14 et sa région homologue (69394-71453 pb) du BAC 1793L02-Re. Cette différence consiste en un polymorphisme de deux nucléotides (GT) dans un SSR précédemment dérivé de la séquence du BAC 1793L02-Re. Le produit amplifié à l'époque était non spécifique et illisible. En nous basant sur la comparaison de séquence, nous avons réussi à définir une paire d'amorces (F-5'CTGCAGTCTCATCCGCTGCTT3' et R-5'ATGGCTTGATACTGGCAACC3'), dont le produit PCR nommé cfb382, est unique et spécifique du chromosome 5B, permettant ainsi sa détection sur séquenceur capillaire. Ce marqueur s'est révélé polymorphe entre MP98 et Ct et a ainsi pu être cartographié dans la population de 50 SSD recombinants. Il est complètement lié au gène *SKr* (Figure 32 et 33). Le marqueur cfb382 est physiquement proche (~25 kb) du marqueur cfb306 précédemment cartographié qui est, à son tour, localisé à ~7,5 kb de l'extrémité du BAC 1793L02-Re. Les deux marqueurs cfb306 et cfb382 sont donc localisés dans les derniers 32 kb d'un contig physique de ~200 kb correspondant au clones BAC 2163O14 et 1793L02-Re (Figure 32). Ces résultats démontrent une vraie difficulté pour trouver un marqueur polymorphe dans les premiers 170 kb du contig physique. Cependant, le séquençage partiel du BAC 2163O14

laisse la possibilité de compléter le séquençage du clone BAC et de dériver de nouveaux marqueurs.

III. Discussion

Dans la partie précédente nous avons pu, grâce à l'analyse phénotypique et génotypique d'une population recombinante de 50 SSD, caractériser le gène *SKr* contrôlant l'aptitude du blé hexaploïde (*T. aestivum*) au croisement avec le seigle (*S. cereale*) comme un facteur mendélien et augmenter la résolution de la carte génétique en rajoutant 8 nouveaux marqueurs, qui étaient cependant tous en position proximale par rapport au locus *SKr*. Ici, l'exploitation des relations synténiques du blé avec l'orge et le riz, nous a permis d'augmenter significativement la résolution de la carte génétique dans la région de *SKr* avec 4 nouveaux marqueurs dont 3 complètement liés au gène *SKr* (cfb341, cfb306 et cfb382) et pour la première fois un marqueur (GBR0233) cartographié en position très proche de *SKr* du côté distal.

Au cours de cette approche nous avons tenté, dans un premier temps, d'exploiter les relations de colinéarité entre le blé et le riz, l'espèce modèle pour les céréales avec un génome complètement séquencé (GOFF *et al.* 2002; YU *et al.* 2002). Les études antérieures de cartographie comparative menées chez les céréales ont mentionné une bonne relation de colinéarité entre le blé et le riz à large échelle (FEUILLET and KELLER 2002; MOORE *et al.* 1995a; SORRELLS *et al.* 2003) et une relation de colinéarité plus complexe à des échelles plus fine (cM et séquence) (BENNETZEN and RAMAKRISHNA 2002; FEUILLET and KELLER 2002). Une meilleure conservation a été, généralement, observée dans les régions proximales (SANMIGUEL *et al.* 2002; YAN *et al.* 2003) que dans les régions distales (FEUILLET and KELLER 1999; KILIAN *et al.* 1997; LI and GILL 2002; LINKIEWICZ *et al.* 2004) et certains groupes chromosomiques présentent de meilleurs taux de conservation que d'autres. Ainsi le groupe 3 de blé et le chromosome 1 de riz sont les mieux conservés tandis que le groupe d'homéologie 5 représente une des relations synténiques les plus complexes avec le riz (MOORE 1995b; SORRELLS *et al.* 2003). LINKIEWICZ *et al.* (2004) ont réalisé une analyse de colinéarité à haute résolution entre les chromosomes du groupe 5 (5A, 5B et 5D) du blé et le riz en utilisant un total de 2555 locus d'ESTs physiquement assignés aux différents bins de délétion. Les auteurs ont révélé que le groupe 5 du blé est, généralement, colinéaire avec les chromosomes 12, 9 et 3 du riz. L'analyse de 50 ESTs physiquement assignés au bin de délétion distale (5BS6) a confirmé ces relations complexes avec seulement un tiers des EST (17 ESTs) alignées au chromosome 12 de riz, 13 n'ayant identifié aucun hit, et le reste

distribué sur 7 autres chromosomes de riz. Cette complexité n'a donc pas permis l'utilisation directe du riz comme source de nouveaux marqueurs pour la région de *SKr* montrant les limites de l'utilisation du riz lorsque les distances génétiques sont encore relativement larges autour d'un locus cible chez le blé.

La cartographie génétique de gènes/de marqueurs ADNc à proximité du gène *SKr* devenait une nécessité majeure pour identifier précisément la région synténique sur le génome du riz. Cependant, la cartographie génétique d'EST est longue et laborieuse chez le blé car elle nécessite la définition d'amorces génome-spécifiques pour chacune des EST. Les 50 EST assignés au bin de délétion distal du chromosome 5BS n'étant pas génétiquement ordonnées il était compliqué de définir par défaut 150 (50 x3) amorces génomes spécifiques sans avoir plus de précision sur les EST potentiellement proches du gène *SKr*. La construction en 2006 d'une carte génétique d'orge établie principalement à partir de marqueurs ADNc (STEIN *et al.* 2007) nous a permis de contourner ce problème en nous permettant de localiser une EST d'orge proche de *SKr* et d'établir finalement la relation synténique avec le chromosome 12L du riz. Ceci illustre l'importance du développement des ressources d'orge pour soutenir les projets de génomique du blé et renforce le fait que l'orge est de loin le meilleur modèle pour le blé chez les graminées. L'orge appartient à la même tribu que le blé, les Triticées, il partage le même nombre de chromosomes de base (7), et a divergé du blé il y a seulement 10-14 millions d'années, au contraire de *Brachypodium* (BOSSOLINI *et al.* 2007) et du riz (WOLFE *et al.* 1989) qui ont divergé du blé il y a 30 et 50 millions d'années, respectivement et ont subi de nombreux réarrangements de leurs chromosomes (BOLOT *et al.* 2009). De plus, l'orge étant diploïde, la cartographie d'EST est bien plus aisée que chez le blé hexaploïde. La mise en place de plateformes de cartographie de gènes à haut débit chez l'orge (OPA1; <http://harvest.ucr.edu/Barley1.htm>) et la construction des cartes physiques ancrées du blé et de l'orge via des consortia internationaux (www.wheatgenome.org; www.barleygenome.org) vont permettre d'augmenter rapidement l'efficacité des projets de clonage positionnel de gènes de blé dans un futur proche.

Plusieurs projets de clonage positionnel chez le blé ont déjà révélé les limites de l'utilisation du riz ou de *Brachypodium* comme génomes modèles pour identifier des gènes candidats, en particulier pour ce qui concerne les gènes de résistance aux maladies (KELLER *et al.* 2005). D'autres études ont montré que les gènes et les QTL impliqués dans le processus de développement de la plante et qui ont été sélectionnés durant la domestication du blé sont conservés entre le riz et les autres génomes des céréales (BAILEY *et al.* 1999; LIN *et al.* 1995; PATERSON *et al.* 1995) et peuvent être isolés plus rapidement par clonage direct. Le meilleur

exemple à ce jour de l'efficacité de l'utilisation du riz pour le clonage direct d'un gène chez les autres céréales est le clonage du gène de nanisme chez le riz (*Sd1*,) (MONNA *et al.* 2002), chez le blé (*Rht-1*) et le maïs (*D8*) (PENG *et al.* 1999).

Il sera intéressant de voir si le gène d'aptitude au croisement, *SKr*, est conservé entre le blé et le riz ou *Brachypodium* comme le sont le plus souvent les gènes liés au développement de la plante. Pour l'instant, nous pouvons seulement spéculer sur les candidats possibles dans la région du chromosome 12 et sur les deux gènes des chromosomes 1 et 2 orthologues à la région de *SKr* sur le 5BS (Figure 32). Les analyses génétiques et biochimiques ont suggéré que l'inhibition de l'aptitude au croisement est un mécanisme actif et que les gènes d'aptitude au croisement peuvent coder pour un produit qui arrête la pénétration des tubes polliniques de seigle entre la base de style et le sac embryonnaire, *i.e.*, juste avant la fécondation (CAMERON and REGER 1991; JALANI and MOSS 1980; JALANI and MOSS 1981; LANGE and WOJCIECHOWSKA 1976). Chez les dicotylédones, l'analyse moléculaire de l'auto-incompatibilité et le rejet du tube pollinique entre les espèces a identifié un rôle clé pour les gènes *S*-RNase (FRANKLIN-TONG and FRANKLIN 2003) ainsi que les récepteur kinases (ESCOBAR-RESTREPO *et al.* 2007). Chez le riz, de nombreuses études ont identifié plusieurs locus impliqués dans le contrôle des barrières de la reproduction inter sous-spécifique et interspécifique via la prévention de la fécondation, la stérilité mâle des hybrides, l'avortement du sac embryonnaire ou la mortalité des hybrides. Ils ont été cartographiés sur les chromosomes 1 (*S₂₄*, KUBO *et al.* 2008), 2 (*S₃₂*, LI *et al.* 2007), 5 (*S₃₁*, *S₃₅*, KUBO *et al.* 2008; ZHAO *et al.* 2007), 6 (*S₁*, *S₅*, *esa-1*, CHEN *et al.* 2008; LIU *et al.* 2000; QIU *et al.* 2005), et 12 (*esa-2* et *esa-3*, LIU *et al.* 2000) sans qu'aucun de ces locus ne soit localisé dans les régions du riz orthologues de la région de *SKr* sur le chromosome 5BS de blé. Le gène *S5* a été récemment cloné (CHEN *et al.* 2008), il code une protéase aspartique contrôlant la fertilité du sac embryonnaire. Aucun des 11 gènes au locus *SKr*, inclus les 9 gènes colinéaires entre le blé et le chromosome 12 et les deux gènes colinéaires avec les chromosomes (1 et 2) du riz, n'a révélé de l'homologie avec ce type de gène. Ainsi, il sera intéressant de voir si *SKr* correspond à un nouveau type de gène.

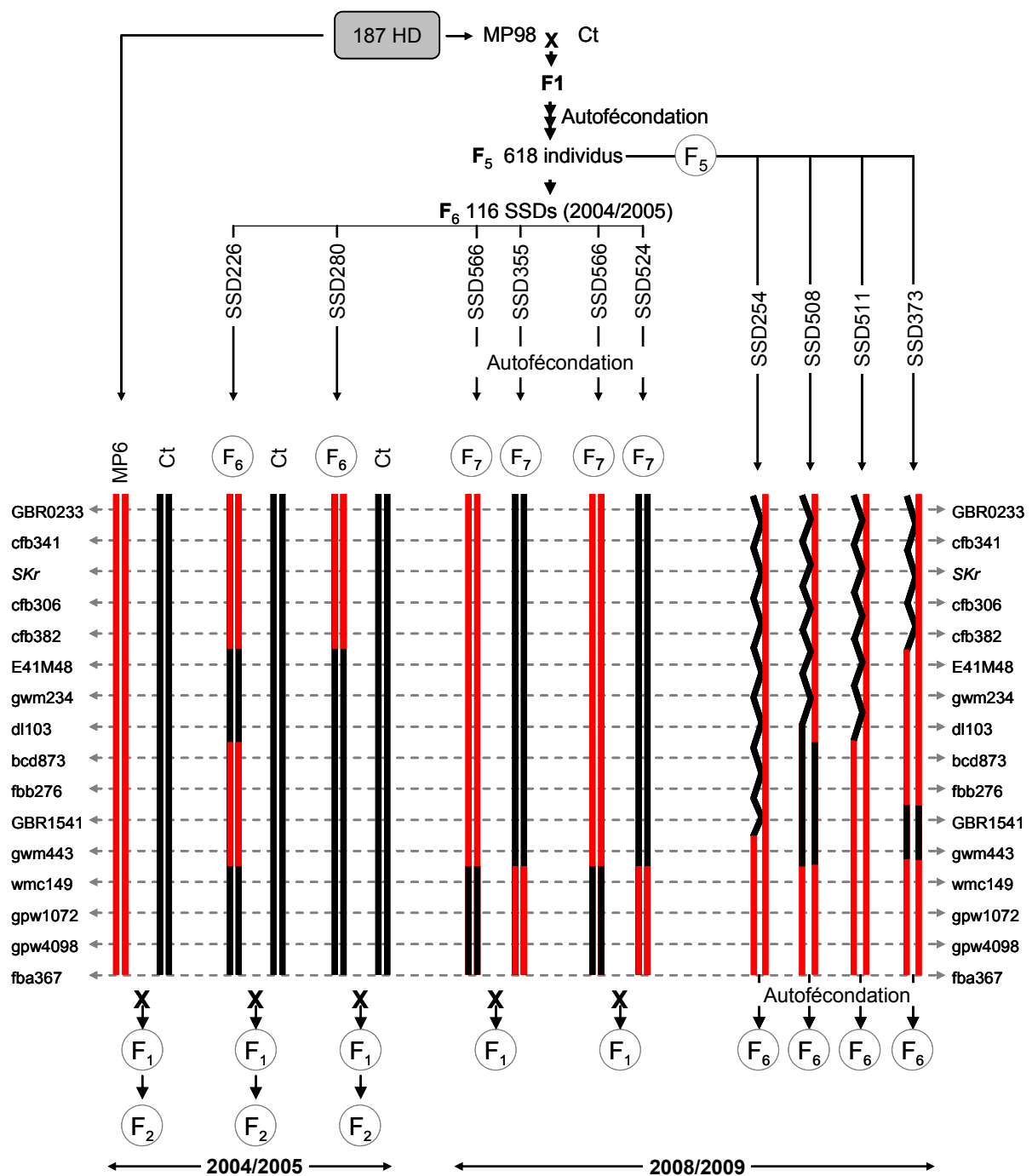
L'une des difficultés potentielles qui nous rencontrerons dans l'étape finale du clonage positionnel du gène *SKr* est liée au faible taux de polymorphisme observé dans la région de *SKr/GSP-5B* sur le chromosome 5BS. Parmi les 75 marqueurs (38 SSRs et 37 ISBPs) identifiés sur un contig physique de 200 kb (BAC 2163O14 et 1793L02-Re), seulement deux marqueurs SSR (*cfb306* et *cfb382*) localisés dans les derniers 32 kb du contig se sont révélés polymorphes entre MP98 et Ct. Ceci signifie qu'il y a, pour l'instant, une difficulté à identifier

un marqueur polymorphe dans les premiers ~170 kb du contig. Le fait que le clone BAC 317L24 séquencé partiellement se soit avéré finalement provenir du chromosome 5D, ne nous a peut être pas permis d'exploiter tout le potentiel de polymorphisme dans cette région. Cependant, le séquençage de 1464 pb sur la copie 5B du gène *plasma membrane ATPase1* n'a révélé aucune différence de séquence entre les parents MP98 et Ct même dans les régions introniques ce qui est peu encourageant. Le plus surprenant, est la très forte similarité (seulement 58 SNPs) observée entre les séquences orthologues de *T. aestivum* (CT009585) et *T. turgidum* (CT009588) au locus GSP sur le chromosome 5BS (CHANTRET *et al.* 2008; CHANTRET *et al.* 2005), confirmé ici par l'observation de seulement 37 SNP entre les séquences de Chinese Spring et Renan à ce même locus. Une des explications possibles est que certains gènes présents dans cette région ont des fonctions importantes et que leurs mutations délétères ont été contre sélectionnées durant les processus de domestication et de sélection. Alternativement, certains gènes de la région pourraient avoir été sélectionnés pour leur effet positif sur un caractère agronomique majeur, introduisant une réduction de la diversité dans cette région.

Le phénomène de réduction de la diversité dans une région portant un caractère d'intérêt agronomique qui aurait été fortement sélectionné durant la domestication ou par sélection naturelle est connue sous le nom d'effet "hitchhiking" ou d'effet de balayage sélectif "selective sweep" (KAPLAN *et al.* 1989; SMITH and HAIGH 1974). Un balayage sélectif affecte la diversité génétique, non seulement au niveau du locus spécifique contenant une mutation favorable, mais aussi au niveau des allèles voisins sur le même chromosome qui sont fixés simultanément (KAPLAN *et al.* 1989; SMITH and HAIGH 1974). Chez le riz, OLSEN *et al.* (2006) ont évalué les limites physiques du balayage sélectif autour du gène *Waxy* (*Wx*) lors de la domestication. Ils ont montré qu'une mutation au niveau du site d'épissage (5') sur l'intron 1 du gène *Waxy* avait joué un rôle crucial sur l'origine des variétés tempérées du riz "*Japonica*" non glutineuses, à faible contenu d'amylose, qui constitue un élément principal des cuisines d'Asie du Nord. Les auteurs ont comparé le ratio de diversité nucléotidique sur des individus avec et sans la mutation dans une région de 500 kb autour de *Wx*. Ils ont trouvé un fort balayage sélectif réduisant la diversité nucléotidique dans un intervalle de 250 kb chez les individus porteurs de la mutation. A notre connaissance aucune étude similaire n'a encore été réalisée chez le blé. Les ressources qui seront générées pour le clonage de *SKr* (e.g. séquences de BAC de différentes variétés au locus) devraient nous permettre de réaliser ce type d'analyse.

Ainsi, dans cette partie de l'étude, nous avons établi deux contigs physiques d'environ 300 kb et 120 kb au locus *SKr*. Le fait que les contigs de BACs au locus *SKr* couvrent seulement 54 kb sur le chromosome 12L de riz suggère que la distance physique entre les deux contigs ne soit pas très large et qu'une seule étape de marche sur le chromosome puisse être suffisante pour lier les deux contigs. Puisque les 50 recombinants SSD de la population MP98 x Ct n'ont pas été sélectionnés avec deux marqueurs flanquants, nous ne sommes pour l'instant pas certains que les contig physiques flanquent le gène *SKr*. De plus, les distances génétiques obtenues entre les marqueurs distaux par rapport au marqueur dl103 sont sûrement sous-estimées. L'ordre des marqueurs très liés au gène *SKr* ainsi que l'orientation de la carte génétique restent donc à confirmer sur une nouvelle population de cartographie. Dans ce contexte, 4 SSDs (254, 373, 508 et 511) hétérozygotes au locus distaux y compris *SKr* ont été identifiés parmi les 116 SSDs testés de la population MP98 x Ct. Ils offrent un intérêt particulier, l'autofécondation de ces individus permettant d'obtenir rapidement de nouvelles populations dans lesquelles il sera possible d'étudier une ségrégation 1:2:1 pour les marqueurs co-dominants et une ségrégation 1:3 pour des marqueurs dominants. C'est dans cette optique que nous avons développé de nouvelles populations dans la dernière partie de la thèse.

4^{ème} Partie : Développement de Nouvelles Populations et Etablissement d'une Nouvelle Carte Génétique



I. Matériels et Méthodes

1. Développement de nouvelles populations : Saison 2004/2005

Dans l'étude précédente, LAMOUREUX (2002) a suggéré que la population MP98 x Ct n'était pas idéale pour la cartographie fine car MP98 contient des résidus d'allèles de Chinese Spring pour deux autres QTL mineurs sur les chromosomes 5AL et 7AL. Par contre, il a mentionné que MP98 porte l'allèle de Ct au locus *Kr1* sur 5BL. Pour cette raison et du fait des problèmes de sélection non optimale des recombinants au locus *SKr* évoqués dans les chapitres précédents, nous avons inclus dans le plan des travaux de thèse initial le développement de nouvelles populations de cartographie fine nécessaires pour isoler le gène *SKr* par clonage positionnel. L'étude de Lamoureux (2002) avait identifié trois lignées "croisables", une lignée HD (MP6) et deux lignées de la population de SSD (SSD226 et SSD280), comme candidates à croiser avec le parent Ct "non croisable". Nous avons donc démarré dès 2004/2005 le développement de ces populations en parallèle des travaux de cartographie génétique sur la population MP98 x Ct.

1.1. MP6 x Ct

La lignée HD MP6 (une lignée sœur de MP98) issue des 187 HD de la population Ct x CS (*cf.* Figure 17), a montré une très bonne aptitude au croisement avec le seigle (aptitude au croisement maximum de 80%) selon LAMOUREUX (2002), et de 95% selon nos résultats. MP6 a été identifiée (LAMOUREUX 2002) comme portant les allèles de CS "croisable" sur le bras court du chromosome 5BS (*SKr*) et les allèles de Ct "non croisable" sur les chromosomes 5BL (*Kr1*), 5AL (*Kr2*) et 7AL (QTL 7A). Nous avons utilisé cette lignée comme parent mâle pour un rétrocroisement avec le parent récurrent Ct (Figure 35) et développé une population F₂ de grande taille (> 2000 individus).

1.2. SSD226 x Ct

La lignée SSD226 issue de la population MP98 x Ct (Figure 35) s'est montrée apte au croisement avec le seigle (aptitude au croisement maximum de 45%) selon LAMOUREUX (2002), et de 85% selon nos résultats. L'aptitude au croisement limitée (45%) observée dans l'étude précédente pourrait provenir de conditions sub-optimales (1 épi testé). Selon LAMOUREUX (2002), SSD226 présente des allèles de Ct pour les marqueurs dl103 et gpw1072 sur 5BS (Figure 35) ainsi que pour tous les autres locus sur 5BL (*Kr1*), 5AL (*Kr2*) et 7AL (QTL 7A). La lignée SSD226 (F₆) qui doit porter les allèles d'aptitude au croisement de

Chinese Spring au locus *SKr* a été croisée avec Ct pendant la saison 2004/2005 pour créer une nouvelle population de cartographie fine. Une population de grande taille (>2000 individus) a été obtenue suite à l'autofécondation des hybrides F₁ (Figure 35).

1.3. SSD280 x Ct

La lignée SSD280 issue de la population MP98 x Ct a montré une très bonne aptitude au croisement avec le seigle (85%) selon LAMOUREUX (2002), et de 80% selon nos résultats. Selon LAMOUREUX (2002), cette lignée possède tous les allèles de Ct pour 5BL (*Kr1*), 5AL (*Kr2*), 7AL (QTL 7A) et gpw1072 sur le 5BS tandis qu'elle porte l'allèle de MP98 et CS pour le locus dl103. Cependant, nos résultats de validation indiquent qu'elle porte aussi l'allèle de Ct pour dl103 et pas seulement pour gpw1072 (Figure 35). Il peut s'agir d'une erreur de génotypage au locus dl103 dans l'étude précédente. Nous avons croisé SSD280 (F₆) avec Ct pour créer la troisième population F₂ de cartographie fine (>2000 grains) suite à l'autofécondation des hybrides F₁ pendant la saison 2004/2005 (Figure 35).

2. Développement de nouvelles populations : Saison 2008/2009

A la suite des résultats obtenus sur les populations de 2004-2005 et de la perte de polymorphisme de Ct, de nouvelles populations ont dû être mises en place au cours de l'année 2008. Une partie de ces populations est basée sur le croisement entre des individus SSD croissables et non croissables caractérisés dans notre étude. La deuxième partie était issue de l'autofécondation de 4 individus présentant des résidus d'hétérozygotie au locus *SKr* et aux locus voisins.

2.1. Populations issues de croisements entre SSD

2.1.1. Choix des lignées

SSD355 et SSD524 : Les deux individus F₆ SSD355 et SSD524 issus de la population MP98 x Ct ont montré une bonne aptitude au croisement avec le seigle (aptitude au croisement maximum de 75% pour SSD355, et 90% pour SSD524). Ils possèdent les mêmes allèles issus du parent croissable MP98 pour la majorité des locus distaux et les allèles du parent non croissable Ct pour les locus les plus proximaux (wmc149, gpw1072, gpw4098 et fba367) (Figure 35).

SSD566 : Au contraire des SSD 355 et 524, l'individu F₆ SSD566 issu de la même population MP98 x Ct est complètement inapte au croisement avec le seigle (0%). Il porte les

allèles du parent non croisable Ct pour la majorité des locus distaux et les allèles du parent croisable MP98 pour les locus les plus proximaux (wmc149, gpw1072, gpw4098 et fba367, Figure 35). Le croisement entre cet individu et chacun des autres individus SSD355 et SSD524 doit permettre l'exploitation de tous les marqueurs cartographiés autour du locus *SKr*.

2.1.2. Conditions de l'expérimentation et croisements

Les individus SSD (F_6) ont été autofécondés en 2005 (Figure 35) et nous avons utilisé les grains F_7 dans cette expérimentation. Pour obtenir suffisamment de plantes à croiser, trois grains F_7 de chaque SSD (SSD355.1, SSD355.2 et SSD355.3), (SSD524.1, SSD524.2 et SSD524.3) et (SSD566.1, SSD566.2 et SSD566.3) ont été semés dans des grands pots en plastique contenant un mélange de tourbe et d'engrais à dégradation lente. Après germination, les plantes ont été transférées en chambre de vernalisation à 6°C (début Mai 2008) pour une période de 6 semaines. Puisque la date de l'expérimentation était hors de la période classique de la culture du blé, les plantes ont été ensuite transférées au milieu du mois de Juin 2008 en chambre climatisée (température : 17°C de nuit et 20°C de jour/photopériode : 16H de jour obtenu avec lampes à vapeur au sodium de 400 watts/hygrométrie moyenne de 75%).

A l'épiaison, quand les épis étaient réceptifs, la SSD566 "non croisable" a été utilisée comme parent mâle en croisement avec chacun de SSD "croisables" 355 et 524. Des individus F_1 ont ainsi été obtenus pour les 2 populations (SSD355 x SSD566) et (SSD524 x SSD566) (Figure 35). La procédure de croisement est la même que celle précédemment décrite pour le test avec le seigle (*cf.* 2^{ème} Partie).

2.2. Populations HIF (Heterogeneous inbred family)

2.2.1. Définition

Les lignées HIF se définissent comme étant quasi-isogéniques à la majorité des locus sur le génome et hétérozygotes aux marqueurs liés et flanquant le caractère d'intérêt (TUINSTRA *et al.* 1997). Après autofécondation de telles lignées, des ségrégations de type 1:2:1 (pour les marqueurs co-dominants) et 1:3 (pour les marqueurs dominants) sont observées dans les régions hétérozygotes.

2.2.2. Choix des lignées

Lors de la cartographie génétique sur la partie distale du chromosome 5BS (*cf.* 3^{ème} Partie), quatre lignées SSD (254, 373, 508 et 511) issues des 116 SSD F_6 testés au début des travaux de thèse ont montré des résidus d'hétérozygotie aux locus distaux y compris le locus

d'aptitude au croisement *SKr* (Figure 35). L'intervalle hétérozygote diffère d'une lignée à l'autre : la lignée SSD254 présente l'intervalle hétérozygote le plus large s'étendant du locus le plus distal GBR0233 jusqu'au locus GBR1541 du côté proximal de *SKr*. Les SSD (508 et 511) sont hétérozygotes dans un intervalle intermédiaire (de GBR0233 à dl103) tandis que la SSD373 possède un intervalle hétérozygote plus réduit (de GBR0233 à cfb382) (Figure 35).

Au niveau du phénotype, le test d'aptitude au croisement avec le seigle réalisé en 2005 a montré une aptitude maximum de 5% pour SSD254 (3 épis : 0%, 0% et 5%), de 10% pour SSD373 (3 épis : 0%, 0% et 10%) et de 5% pour SSD508 (2 épis : 0% et 5%) tandis que la SSD511 (2 épis : 0% et 0%) était totalement non croisable. L'autofécondation de telles lignées permet d'observer une ségrégation de type 1:3 au locus *SKr*.

2.2.3. Conditions expérimentales

Chacun des individus hétérozygotes (SSD 254, 373, 508 et 511) identifiés à la génération F_6 est issu d'un épi d'une plante F_5 autofécondée. Afin de réaliser les autofécondations à partir des individus hétérozygotes nous sommes revenus aux sacs des grains F_5 correspondant à ces familles. 20 grains F_5 ont été individuellement semés pour chaque SSD. Après germination, une extraction d'ADN a été réalisée sur les plantes F_6 pour identifier les individus hétérozygotes avec les marqueurs SSR distaux (gwm234, cfb341, cfb382 et cfb306) liés au gène *SKr*. Quatre individus hétérozygotes ont été finalement sélectionnés et autofécondés pour chaque SSD.

Les plantes sélectionnées ont été ensuite transférées en chambre de vernalisation à 6°C pour une période de >10 semaines (14 Mai – 28 Juillet) puis en chambre climatisée (température : 17°C de nuit et 20°C de jour/photopériode : 16H de jour obtenu avec lampes à vapeur au sodium de 400 watts/hygrométrie moyenne de 75%). À l'épiaison, les épis ont été recouverts par des sacs pour assurer l'autofécondation. Ainsi, des grains (F_6 pour la plante/ F_2 pour la région hétérozygote) des 4 sous-populations ont été obtenus pour chaque lignée. Les grains de chacune des sous-populations ont été conservés séparément dans des sacs référencés pour une future utilisation.

2.3. Caractérisation des lignées avec les marqueurs des locus *Kr1* et *Kr2*

Tous les individus SSD servant au développement des nouvelles populations (2008/2009) par croisement (355, 524 et 566) et par autofécondation (254, 373, 508 et 511) ont été caractérisés pour leur composition allélique sur les bras chromosomiques 5BL et 5AL portant respectivement les gènes d'aptitude au croisement *Kr1* et *Kr2*. Ainsi, huit marqueurs

polymorphes du 5BL (gwm213, gwm499, gwm554, gpw3191, gwm271, gpw4160, gpw3076, gwm371, cf. Tableau 7) couvrant la région de *Kr1* et 6 marqueurs polymorphes du 5AL (gwm156, gpw4004, gwm186, gpw4228, gpw7007, gpw2136, cf. Tableau 7) couvrant la région de *Kr2* ont été utilisés. La révélation des allèles s'est faite sur séquenceur capillaire (cf. 2^{ème} Partie).

2.4. Validation de l'aptitude au croisement avec le seigle

Afin de valider que le phénotype obtenu correspond à l'attendu pour le locus hétérozygote à *SKr*, les lignées servant au développement des populations d'autofécondation (2008/2009) ont été vérifiées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe). Le test phénotypique a été réalisé en même temps que l'autofécondation lors du développement des populations HIF. Par contre, nous n'avons malheureusement pas pu tester le phénotype des lignées servant aux croisements (SSD : 355, 524 et 566) parce que le pollen du seigle n'était pas encore disponible, faute d'un semi tardif des grains de seigle.

2.5. Cartographie génétique à partir de la population HIF SSD254.14 (2009)

2.5.1. Principe du choix

La sous-population SSD254.14 a été choisie pour initier la cartographie fine du gène *SKr* car la lignée présentait l'intervalle hétérozygote le plus large (de GBR2033 à GBR1541, Figure 35) et permettait d'exploiter le maximum de marqueurs cartographiés sur la partie distale du bras chromosomique 5BS. Au total, 223 individus ont été testés pour leur aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe) afin de localiser *SKr* sur la carte génétique obtenue après analyse de liaison des marqueurs liés à *SKr*.

2.5.2. Extraction d'ADN et génotypage

L'extraction d'ADN des 223 individus a été réalisée au stade 8-10 feuilles en utilisant le protocole CTAB 1.3X (cf. 2^{ème} Partie 1).

2.5.3. Test d'aptitude au croisement avec le seigle

Le test d'aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe) s'est fait selon la technique décrite précédemment (cf. 2^{ème} Partie I.3). Trois épis par plante ont été testés afin de diminuer l'effet des erreurs expérimentales. Ainsi, un total de ~700 épis ont été émasculés et pollinisés avec le pollen de seigle. Pour assurer la production de pollen du

seigle durant toute la durée du test, 4 semis de seigle séparés d'une semaine (5 plantes par échelon) ont été réalisés. Finalement, les parents des populations initiales "Ct *mono 5B* x CS" et "MP98 x Ct" ont aussi été testés pour servir de références.

NB : les deux premiers semis de seigle étaient peu exploitables, du fait de la croissance tardive de la lignée SSD254. Ainsi, pour exploiter au maximum le pollen de seigle, la pollinisation ne s'est pas faite par transfert du pollen direct de l'épi de seigle à l'épi de blé, mais en collectant le pollen de seigle dans une boîte de pétri puis en réalisant la pollinisation à l'aide d'un pinceau. Avec cette méthode, la source de pollen est changée toutes les 7 minutes environ. La validité de cette méthode a été vérifiée en testant plusieurs épis en 2005.

2.6. Validation de l'ordre des marqueurs sur la population Re x CS.

94 individus de la population F₂ Renan x CS (Re x CS) disponibles au laboratoire et décrits par SAINTENAC *et al.* (2009) ont été utilisés pour tester et cartographier certains marqueurs SSR (gpw4098, cfb306, cfb341 et gwm234, Figure33) afin de vérifier l'ordre des marqueurs et l'orientation de la nouvelle carte génétique. La quantité limitée d'ADN disponible pour cette population a empêché l'ajout des marqueurs RFLP à ce test.



Figure 36 : Obtention de 1850 plantes F2 de la population SSD226 x Ct (2007) en format de plaque 96.

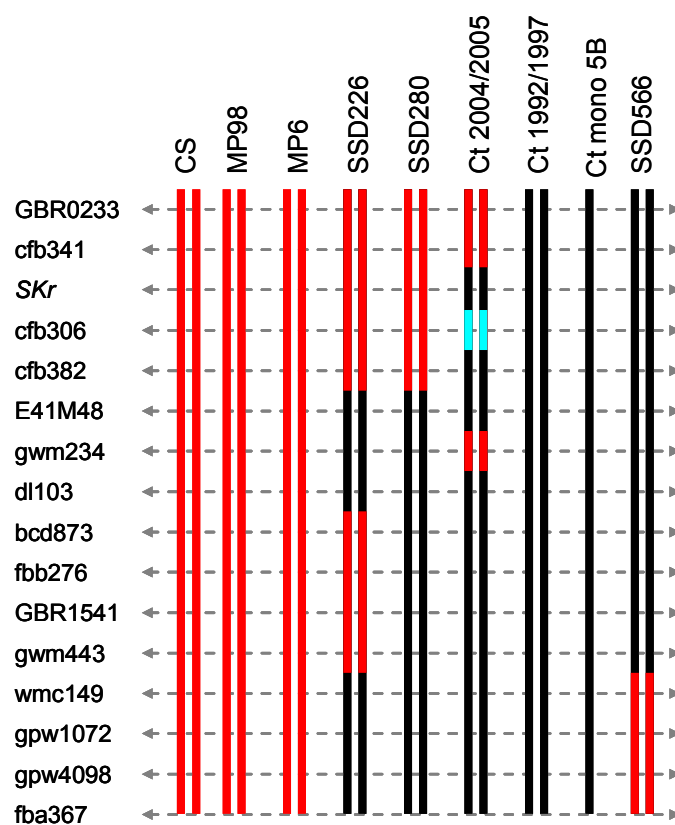


Figure 37 : Composition allélique aux marqueurs cartographiés sur la partie distale de 5BS. Le Courtot actuellement utilisé au laboratoire (Ct 2004/2005) possède un fond génétique différent de celui-ci qui a été utilisé pour développer les populations MP98 x Ct (Ct 1992/1997). En rouge : les allèles de MP98 et CS. En noir : les allèles de Ct d'origine (1998). En vert, les nouveaux allèles du Ct 2004/2005 aux locus cfb306 et cfb382.

II. Résultats

1. Analyse des populations créées en 2004/2005

Les populations *SSD226xCt*, *SSD280xCt* et *MP6xCt* ont été développées au début des travaux de thèse (saison 2004/2005 ; Figure35) dans le but de réaliser la cartographie génétique fine de la région du gène *SKr* et de s'affranchir de la population de recombinants issus du croisement MP98 x Ct.

1.1. Analyse de la population F2 SSD226 x Ct

2200 grains F₂ de la population SSD226 x Ct ont été semés et 1850 plantes F₂ ont été obtenues pendant la saison 2007/2008. Les plantes ont été semées en plaques de format 96 (Figure 36) pour faciliter l'extraction d'ADN et l'analyse des plantes à haut débit à l'aide des nouveaux marqueurs identifiés dans la région du gène *SKr*.

1.2. Disparition du polymorphisme dans la région de *SKr*

Dans une première étape nous avons voulu sélectionner les recombinants de la population F₂ SSD226 x Ct entre les marqueurs BCD873 et GBR0233 (Figure 37). Cependant l'analyse des résultats des marqueurs GBR0233, cfb341 et gwm234 a montré que le polymorphisme observé dans la population MP98 x Ct avait disparu car les allèles de Ct étaient devenus identiques à ceux de la SSD226 et MP98 (Figure 37). De plus, pour les marqueurs cfb306 et cfb382, les tailles des allèles de Ct étaient devenues différentes. Par contre, le polymorphisme était resté identique à celui de la population initiale pour les locus proximaux (de dl103 à fba367) et les locus situés sur les chromosomes 5BL (gwm213, gwm499, gwm554, gpw3191, gwm271, gpw4160, gpw3076, gwm371) et 5AL (gwm156, gpw4004, gwm186, gpw4228, gpw7007, gpw2136).

Ces résultats suggèrent que le parent Courtot employé pour la création des nouvelles populations (Ct 2004/2005) est différent au locus *SKr* du Courtot (Ct 1992/1997) utilisé en 1998 pour développer la population initiale MP98 x Ct (LAMOUREUX 2002). Malheureusement, le parent utilisé en 1998 n'était plus disponible au laboratoire et nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse directement sur la lignée initiale. Ce résultat remet en cause l'intérêt des 3 populations SSD226 x Ct, SSD280 x Ct et MP6 x Ct pour la cartographie fine de *SKr* et nous a obligé à définir une nouvelle stratégie.

Tableau 15 : Bilan de croisement F₇ SSD355 x F₇ SSD566. (-) signifie qu'aucun croisement n'a été réalisé entre les numéros croisés.

♀ \ ♂	SSD 566-1	SSD 566-2	SSD 566-3	Total grains F ₁
SSD 355-1	-	-	19	19
SSD 355-2	-	39	23	62
SSD 355-3	17	-	23	40
Total grains F1	17	39	65	121

Tableau 16 : Bilan de croisement F₇ SSD524 x F₇ SSD566.

♀ \ ♂	SSD 566-1	SSD 566-2	SSD 566-3	Total grains F ₁
SSD 524-1	43	68	-	111
SSD 524-2	22	51	-	73
SSD 524-3	-	-	-	-
Total grains F1	65	119	-	184

Tableau 17 : Quatre individus F₆ ont été sélectionnés pour chacune des lignées SSD (254, 373, 508 et 511) hétérozygotes au locus distaux dans la région de *SKr* sur le chromosome 5BS. (H) : hétérozygote. La lignée SSD373 présentant l'intervalle hétérozygote le plus réduit possède l'allèle de MP98 (B) au locus gwm234.

SSD254					SSD373				
Individu	cfb341	cfb306	cfb382	gwm234	Individu	cfb341	cfb306	cfb382	gwm234
SSD254.01	H	H	H	H	SSD373.01	H	H	H	B
SSD254.13	H	H	H	H	SSD373.03	H	H	H	B
SSD254.14	H	H	H	H	SSD373.10	H	H	H	B
SSD254.15	H	H	H	H	SSD373.14	H	H	H	B
SSD508					SSD511				
Individu	cfb341	cfb306	cfb382	gwm234	Individu	cfb341	cfb306	cfb382	gwm234
SSD508.01	H	H	H	H	SSD511.01	H	H	H	H
SSD508.02	H	H	H	H	SSD511.03	H	H	H	H
SSD508.11	H	H	H	H	SSD511.09	H	H	H	H
SSD508.17	H	H	H	H	SSD511.10	H	H	H	H

Tableau 18 : Estimation du nombre de grains obtenu par plante et par lignée suite à l'autofécondation des plantes F₆ servant à créer des nouvelles populations HIF.

Individu	Grains	Individu	Grains	Individu	Grains	Individu	Grains
SSD254.1	>1500	SSD373.1	>1000	SSD508.1	>600	SSD511.1	>1000
SSD254.13	>1500	SSD373.3	>1000	SSD508.2	>600	SSD511.3	>1000
SSD254.14	>1500	SSD373.10	>1000	SSD508.11	>600	SSD511.9	>1000
SSD254.15	>1500	SSD373.14	>1000	SSD508.17	>600	SSD511.10	>1000
Total	>6000		>4000		>2400		>4000

2. Développement de nouvelles populations à partir des individus de la SSD (2008/2009)

En absence de lignée parentale Ct 1992/1997 et pour pouvoir continuer à exploiter le polymorphisme observée dans la SSD issue de MP98 x Ct au locus *SKr*, nous avons déployé deux approches utilisant directement les individus de la population SSD afin de développer des nouvelles populations de cartographie fine. La première est basée sur la création de populations F₂ à partir du croisement entre individus SSD croisables et non croisables. La lignée SSD566 (non croisable) possédant les allèles de Ct d'origine pour la majorité des locus distaux (de GBR0233 à gwm443) et les allèles de MP98 aux locus proximaux (de wmc149 à fba367) a été sélectionnée et croisée avec deux SSD croisables (SSD355 et SSD524) qui possédaient les allèles de MP98 au locus distaux et de Ct aux locus proximaux (Figure 35). Avec ce type de population, tous les marqueurs cartographiés sur le chromosome 5BS devenaient exploitables.

Au total, 121 et 184 grains hybrides "F₁" ont été obtenus pour chacun des croisements F₇ SSD355 x F₇ SSD566 (Tableau 15) et F₇ SSD524 x F₇ SSD566 (Tableau 16). La SSD524-3 a été exclue des croisements car elle présentait une morphologie différente (très courte) de celle des autres SSD sœurs (524-1 et 524-2) qui étaient homogènes entre elles.

La deuxième approche de type HIF (*Heterogeneous inbred family*) a consisté à identifier des individus SSD comprenant des résidus d'hétérozygotie au locus *SKr* et à les autoféconder pour obtenir directement une descendance de type F₂ ségrégeant pour le caractère d'aptitude au croisement. Quatre SSD hétérozygotes (SSD 254, 373, 508 et 511, cf. Figure 35) ont été identifiées parmi les 116 SSD qui nous avaient été transmises de l'étude précédente (cf. 2^{ème} Partie) et utilisées pour développer des populations par autofécondation. Puisque ces individus hétérozygotes ont été identifiés à la génération F₆, l'identification d'autres lignées hétérozygotes s'est faite en revenant au même sac de grains d'un épi F₅ autofécondé pour chaque lignée. Parmi les 20 grains semés de chaque lignée afin d'obtenir les plantes F₆, nous avons identifié plusieurs hétérozygotes en utilisant les marqueurs proches de *SKr* (cfb341, cfb306, cfb382 et gwm234). Nous en avons finalement sélectionné 4 individus par lignée (Tableau 17).

Après autofécondation des individus sélectionnés, plus de 600 grains par plante ont été obtenus pour la SSD508 et plus de 1000 grains par plante (4 plantes par SSD) ont été obtenus pour chacune des autres SSD (Tableau 18). La lignée SSD254 semblait la plus appropriée car elle possède l'intervalle hétérozygote le plus étendu (Figure 35), permettant ainsi d'exploiter

Tableau 19 : Composition allélique aux locus d'aptitude au croisement *SKr* (5BS), *Kr1* (5BL) et *Kr2* (5AL). Le test a inclus les parents ainsi que les différents individus servant à créer les nouvelles populations de 2008/2009. (a) : allèle de Ct 1992/1997 d'origine. (b), allèles de CS et MP98. (h) : hétérozygotes. (-) : donnée manquante pour SSD508 et absence d'amplification dans les lignées nullisomiques N5B et N5A.

		Ct mono 5B	CS	MP98	MP6	N5A	N5B	SSD254.1	SSD254.13	SSD254.14	SSD254.15	SSD373.1	SSD373.3	SSD373.10	SSD373.14	SSD508.1	SSD508.2	SSD508.11	SSD508.17	SSD511.1	SSD511.3	SSD511.9	SSD511.10	SSD566.1	SSD566.2	SSD566.3	SSD524.1	SSD524.2	SSD355.1	SSD355.2	SSD355.3
5BS	cfb341	a	b	b	b	b	-	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	b	b	b	b	b
	cfb306	a	b	b	b	b	-	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	b	b	b	b	b	
	cfb382	a	b	b	b	b	-	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	b	b	b	b	b	
	gwm234	a	b	b	b	b	-	h	h	h	h	b	b	b	b	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	b	b	b	b	b	
5BL	gwm213	a	b	b	b	b	-	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a
	gwm371	a	b	b	b	b	-	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	h	h	a
	gwm499	a	b	b	b	b	-	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	b	b	b	b	b	h	h	a
	gwm554	a	b	b	a	b	-	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	b	b	b	b	b	h	h	a
	gpw3191	a	b	b	b	b	-	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	b	b	b	b	b	h	h	a
	gwm271	a	b	b	a	b	-	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a
	gpw4160	a	b	b	a	b	-	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a
	gpw3076	a	b	b	a	b	-	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a
5AL	gwm156	a	b	b	b	-	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a
	gpw4004	a	b	b	b	-	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
	gwm186	a	b	b	b	-	b	a	a	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a
	gwm617	a	b	b	b	-	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	b	b	a	a	a
	gpw7007	a	b	b	a	-	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
	gwm666	a	b	b	a	-	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
	gpw2136	a	b	b	a	-	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a

la majorité des marqueurs distaux, et le plus grand nombre de grains par plante permettant d'obtenir une population de cartographie de grand effectif (Tableau 18).

2.1. Caractérisation de la composition allélique aux locus d'aptitude au croisement

La validation de la composition allélique au locus *SKr* (5BS) sur les lignées parentales des nouvelles populations a été réalisée avec les marqueurs SSR distaux gwm234, cfb341, cfb306 et cfb382. De plus, les individus ont été caractérisés pour leurs compositions alléliques sur les bras chromosomiques 5BL (8 SSRs) et 5AL (6 SSRs) portant les autres locus d'aptitude au croisement, *Kr1* et *Kr2*, respectivement (Tableau 19). Très récemment, BERTIN *et al.* (2009) ont obtenu une analyse plus précise de *Kr1* sur le chromosome 5BL. Les auteurs ont détecté deux régions impliquées dans l'aptitude du blé au croisement avec le seigle, la première en position proche du marqueur gwm213, et la seconde en position proche du marqueur gwm371. Ces deux marqueurs étaient inclus dans notre test (Tableau 19). Les résultats montrent une composition homogène pour les individus appartenant à une même lignée. Une exception est observée au niveau de la lignée SSD355 pour laquelle les individus SSD355.1 et SSD355.2 possèdent des résidus d'hétérozygotie aux locus gwm371, gwm499, gwm554 et gpw3191 sur le chromosome 5BL alors que l'individu SSD355.3 possède l'allèle de Ct pour ces locus (Tableau 19).

Les populations issues des croisements (SSD355.3 x SSD566.1) et (SSD355.3 x SSD566.3) qui possèdent les allèles de Ct aux locus *Kr1* (5BL) et *Kr2* (5AL) semblent les plus indiquées pour analyser la ségrégation de *SKr* sur le 5BS.

2.2. Validation du phénotype des lignées hétérozygotes

Les individus servant à la création des nouvelles populations d'autofécondation ont également été validés pour leur aptitude au croisement avec le seigle (var. Dankowskie Nowe). Le phénotype obtenu est généralement conforme à l'attendu avec au maximum 15% d'aptitude observée (Tableau 20). Seuls deux individus SSD254.1 (20% et 45%) et SSD373.1 (25%) ont montré une aptitude intermédiaire dépassant le seuil attendu pour un gène dominant (Tableau 20). Il est possible que ces individus possèdent des résidus de QTL d'autres locus sur d'autres chromosomes que le 5B et le 5A qui modifient légèrement l'inhibition au croisement avec le seigle. La population SSD 254.14 a été choisie pour la poursuite des analyses et le développement d'une nouvelle carte génétique.

Tableau 20 : Bilan du test d'aptitude au croisement (AC) avec le seigle sur les SSDs hétérozygotes (254, 373, 508 et 511) servant à la création des nouvelles populations d'autofécondation. (NC) : non croisable. (C) : croisable.

Individus	AC (%)		Phénotype obtenu	Phénotype attendu
	épi ₁	épi ₂		
SSD254.1	20	45	Intermédiaire	NC
SSD254.13	10	0	NC	NC
SSD254.14	5	0	NC	NC
SSD254.15	0	5	NC	NC
SSD508.1	15	15	NC	NC
SSD508.2	0	10	NC	NC
SSD508.11	0	0	NC	NC
SSD508.17	0	5	NC	NC
SSD373.1	10	25	Intermédiaire	NC
SSD373.3	0	0	NC	NC
SSD373.10	0	0	NC	NC
SSD373.14	0	15	NC	NC
SSD511.1	0	0	NC	NC
SSD511.3	10	15	NC	NC
SSD511.9	0	0	NC	NC
SSD511.10	5	5	NC	NC

Tableau 21 : Test χ^2 pour une ségrégation 1:3 et 1:2:1 pour des marqueurs cartographiés au locus *SKr* sur le 5BS dans les populations SSD254.14 et F₂ Re x CS. (A) : Allèle de Ct ou de Renan, (B) ; Allèle de MP98 et CS, (htz) hétérozygote. (dm) : donnée manquante. Le marqueur gpw4098 dans la population Re x CS est du coté proximal de *SKr*. Le test a été réalisé à l'aide du logiciel MapDisto v1.7.0 (M. Lorieux 2006, <http://mapdisto.free.fr/MapDisto/>). * significatif à <5%, ** significatif à <1%.

Marqueurs	χ^2 3:1	p		hmzA	hmzB	htz	dm	ddl
Phénotype	3,89	0,049	*	-	43	-	0	1
χ^2 1:2:1				SSD254.14				
gwm234	5,65	0,059	ns	69	44	110	0	2
cfb341	8,43	0,015	*	73	43	107	0	2
cfb306	11,67	0,003	**	76	42	102	3	2
cfb382	9,94	0,007	**	75	43	105	0	2
χ^2 1:2:1				F2 Re x Cs				
gwm234	4,25	0,119	ns	31	18	42	3	2
cfb341	6,98	0,031	*	32	14	47	1	2
cfb306	6,31	0,043	*	31	14	48	1	2
gpw4098	1,27	0,531	ns	25	18	47	4	2

3. Phénotypage et génotypage de la population HIF SSD254.14

3.1. Phénotypage

Au total ~700 épis (x 20 fleurs par épi) ont été testés pour 223 individus HIF issus de la lignée SSD254.14. La classe d'aptitude au croisement ("croisable" ou "non croisable") a été déterminée pour chaque individu en se basant sur les deux meilleurs résultats du phénotypage. Les résultats montrent que les 223 individus sont distribués en deux classes bien distinctes : 180 individus dans la classe non croisable (principalement entre 0 et 10% d'aptitude moyenne) et 43 individus dans la classe croisable (45% - 88% d'aptitude moyenne) (cf. Annexe 5 et Figure 38). Cette distribution indique une légère distorsion de ségrégation ($\chi^2 = 3,89^*$; $P < 0.05$, 1 ddl, Tableau 21).

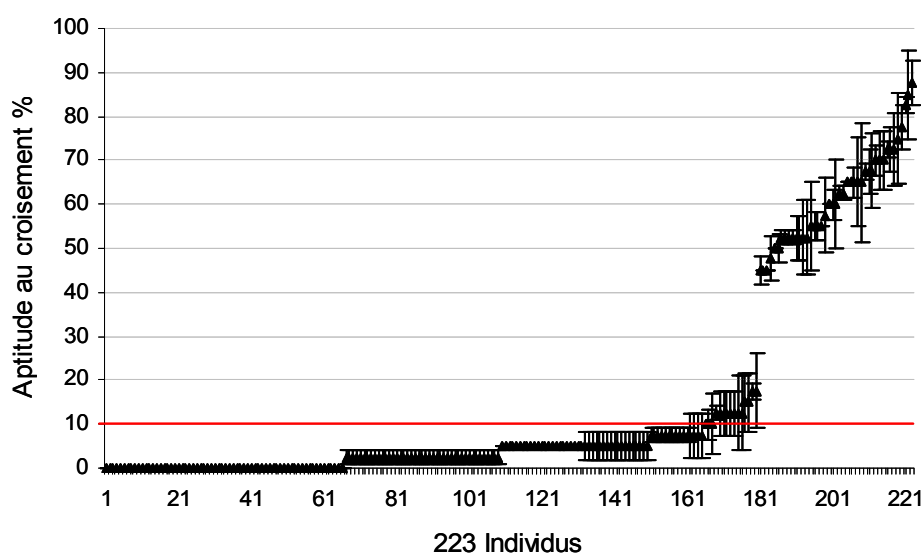


Figure 38 : Aptitude au croisement de 223 individus issus de la population d'autofécondation SSD254.14.

Pour déterminer l'origine de cette distorsion, tous les individus ont été génotypés avec les 4 marqueurs les plus proches de *SKr* (cfb341, cfb306, cfb382 et gwm234). Les résultats montrent que gwm234 ségrège normalement (1:2:1, $\chi^2 = 5,65$; $P < 0.05$, 1 ddl, NS, Tableau 21) tandis que les marqueurs cfb341, cfb306 et cfb382 complètement liés au gène montrent la même distorsion que le phénotype avec une augmentation de la distorsion qui semble donc corrélée avec la proximité du gène. Pour confirmer cette observation, nous avons également analysé la ségrégation pour trois de ces marqueurs (gwm234, cfb341 et cfb306) dans une autre population F_2 issue du croisement entre Renan et Chinese Spring. Les analyses montrent (Tableau 21) le même phénomène et suggère donc que la distorsion observée est due à l'effet

du gène *SKr* ou d'un gène situé à proximité. Le marqueur gpw4098 cartographié du côté proximal de *SKr* a été joint à l'analyse dans la population Re x CS et indique que la ségrégation redevient normale dans la partie proximale du *SKr* (Tableau 21).

Ainsi, il semble qu'un locus induisant de la distorsion de ségrégation soit présent dans la région de *SKr*. De façon intéressante, des facteurs de distorsion de ségrégation (SDR) ont été identifiés récemment sur le long du chromosome 5B par KUMAR *et al.* (2007). Les auteurs ont analysé les ratios de ségrégation de marqueurs dont bcd873 localisé en position distale sur le chromosome 5B, dans des populations de backcross réciproques. Les résultats indiquent que la distorsion de ségrégation la plus sévère (SDR2) sur le 5B est proche du marqueur bcd873 et qu'elle est due à la fécondation préférentielle par des gamètes mâles porteurs des allèles de la variété Langdon. Dans notre étude, bcd873 est cartographié du côté proximal de *SKr* (Figure 25) et il ne semble pas que la distorsion de ségrégation observée dans la région de *SKr* soit aussi sévère que celle observée près de bcd873. De plus, la distorsion concerne le nombre d'allèles homozygotes de type Ct tandis que le nombre des hétérozygotes correspond exactement à 50% de la population (Tableau 21) ce qui semble l'inverse des résultats de KUMAR *et al.* (2007) avec 84 individus homozygotes vs 4 hétérozygotes seulement. Il est possible que les deux phénomènes ne soient pas liés ou que l'effet soit différent en fonction des croisements mais il sera tout de même intéressant de suivre cette piste.

Finalement, une autre explication est possible si l'on considère que l'allèle de MP98 (issu de CS) au locus *SKr* ou à un locus proche a un effet négatif, à l'état homozygote, sur la fécondation, le développement de l'embryon, la germination ou/et le développement de la plante. Dans notre expérimentation, un effectif total de graines de 500 a été semé avec 2 graines par pot suivi de la sélection de la meilleure plante pour aboutir à l'effectif final de 223 plantes. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'un certain biais de sélection ait été appliqué si les graines non germées ou les plantes à développement tardif ou altéré correspondent à des plantes homozygotes pour l'allèle de MP98 (*skr/skr*) à ce locus.

3.2. Cartographie génétique du locus *SKr* dans la population HIF SSD254.14

L'analyse de liaison entre le phénotype et les 4 marqueurs SSR cfb382, cfb306, cfb341 et gwm234 à l'aide du logiciel Mapmaker/Exp v3.0b (LANDER *et al.* 1987) a permis de construire une nouvelle carte génétique du locus *SKr* (Figure 39a). Le résultat confirme que les marqueurs cfb382, cfb306 et cfb341 sont extrêmement proches du gène *SKr* et indique que le marqueur gwm234 est en position distale du gène.

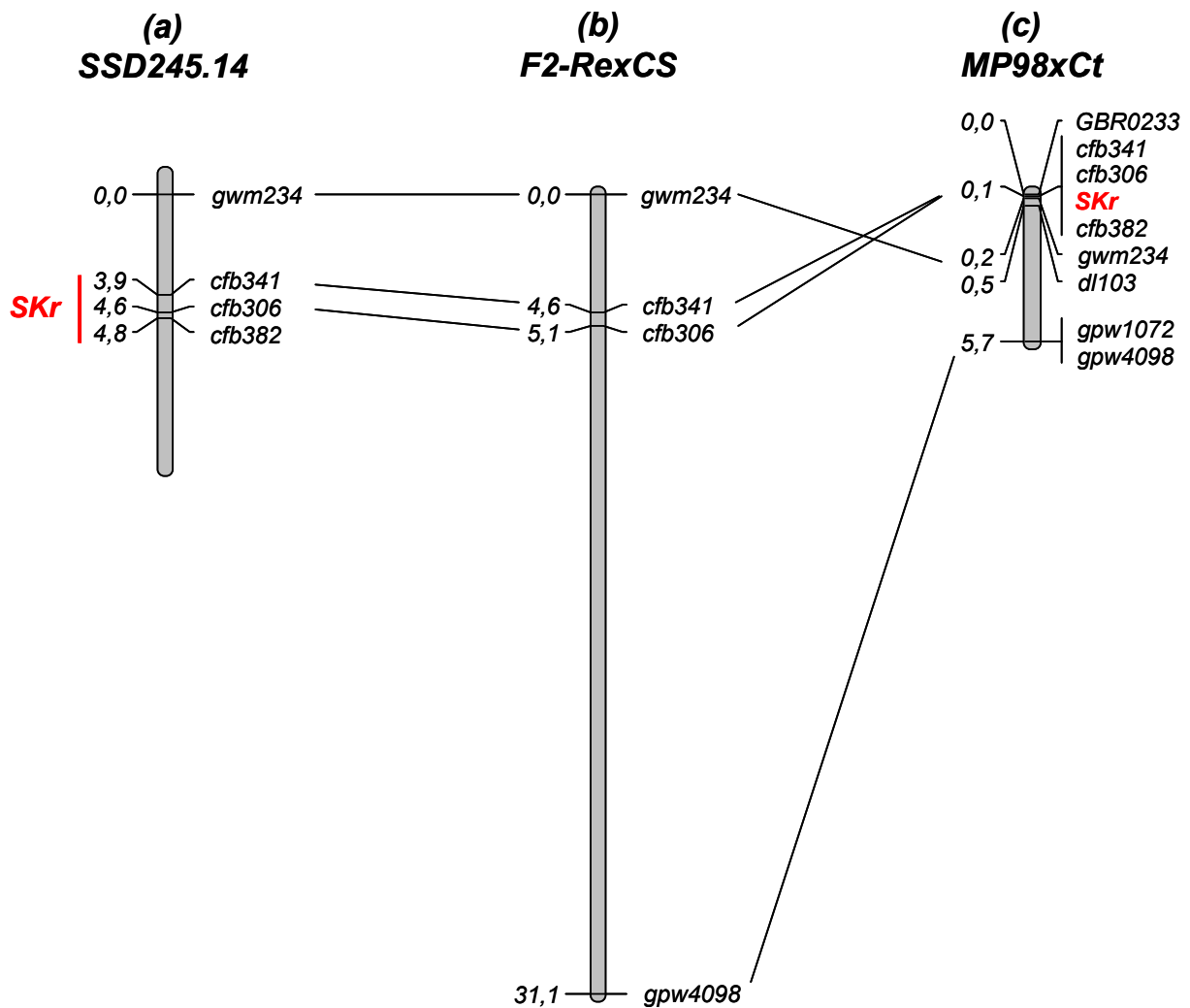


Figure 39 : Cartographie génétique sur la population HIF SSD254.14 et validation des distances génétiques et de l'ordre des marqueurs. (a) : carte génétique de la région *SKr* dans la population d'autofécondation HIF SSD254.14. (b) : validation de l'ordre des marqueurs sur la population F2 Renan x CS (Re x CS). (c) : carte génétique dans la région de *SKr* sur la population recombinante MP98 x Ct.

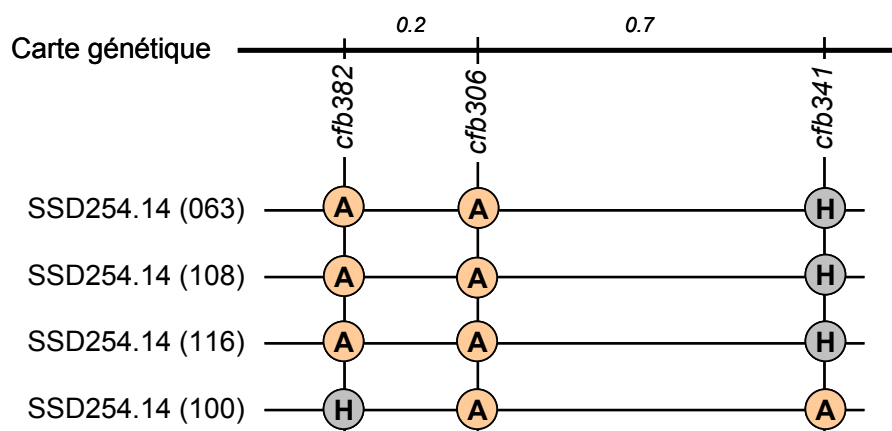


Figure 40 : Quatre individus recombinants entre les marqueurs les plus proches de *SKr*. (A) : allèle de Ct. (H) : allèle hétérozygote.

Pour valider l'ordre des marqueurs et les distances génétiques les marqueurs gpw4098, cfb306, cfb341 et gwm234 ont été testés sur 94 individus de la population F₂ Re x CS (Figure 39b). Les résultats confirment que l'ordre des marqueurs était partiellement incorrect dans la population recombinante MP98 x Ct en particulier pour gwm234 et que les distances génétiques entre les marqueurs étaient sous-estimées (Figure 39c). Ceci était liée à la sélection des recombinants entre deux marqueurs proximaux (gpw1072 et dl103) par rapport à *SKr* (LAMOUREUX 2002).

Bien que des événements de recombinaison aient été détectés entre tous les marqueurs cartographiés sur la nouvelle population SSD254.14 (Figure 39a), le gène *SKr* ne peut pas encore être localisé précisément par rapport aux marqueurs les plus proches (cfb382, cfb306 et cfb341) puisque les individus recombinants sont tous non croisables et que la dominance du gène ne permet pas de distinguer les individus homozygotes des hétérozygotes (Figure 40). Des analyses seront réalisées dans la génération suivante (type F₃) pour lever cette ambiguïté.

3.3. Relations entre la carte génétique HIF SSD254.14 et la carte physique au locus *SKr*

La nouvelle carte génétique HIF SSD254.14 comporte 4 marqueurs dont trois, cfb382, cfb306 et cfb341, proviennent de la carte physique établie au locus *SKr* nous permettant ainsi de relier les deux cartes (Figure 41).

La carte physique comporte un espace entre les contigs de 300 kb en amont et de 120 Kb en aval du gène *SKr*. Cependant, les résultats suggèrent que la distance physique entre ces deux contigs n'est pas très large au vu des forts taux de recombinaison observés dans la région: (1) un événement de recombinaison a été détecté entre les deux marqueurs cfb382 et cfb306 séparés de seulement 25kb sur le clone BAC portant le locus *GSP* (Figure 41B), (2) trois événements de recombinaison sont détectés entre cfb341 inclus dans le gène *pentatricopeptide* et cfb306 localisé à proximité du gène *nodulin*, deux gènes annotés consécutivement (*Os12g44170* et *Os12g44180*, respectivement) sur le chromosome 12L de riz (Figure 41C), (3) dans la population recombinante MP98 x Ct, GBR0233 a été cartographié du côté distal de *SKr* et était séparé par un événement de recombinaison avec le marqueur cfb341 localisé sur le même clone BAC 1731I01 (Figure 41B). La cartographie de GBR0233 (par RFLP) sur la population HIF SSD254.14 est en cours afin de vérifier sa position distale et confirmer définitivement que *SKr* est bien dans l'intervalle physique.

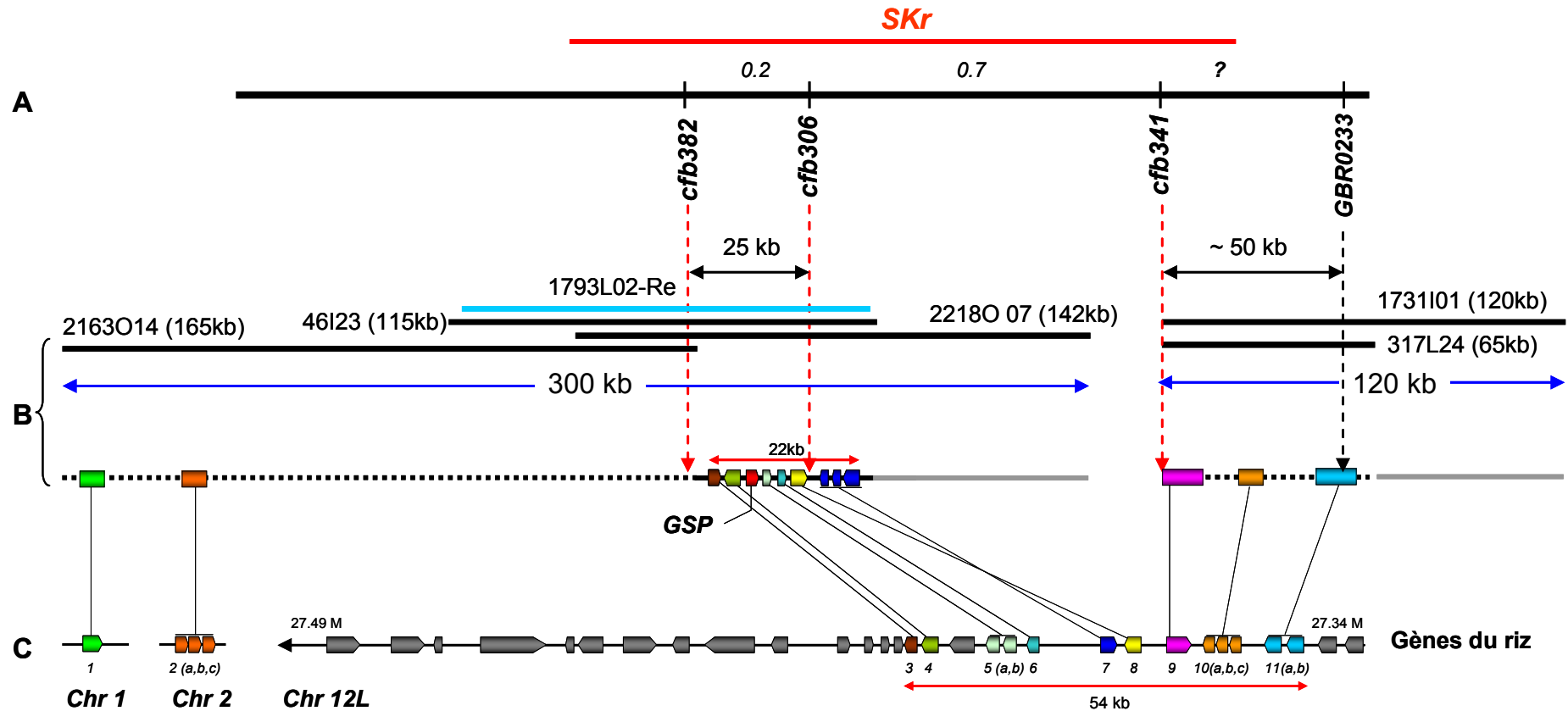


Figure 41 : Relations entre la carte génétique HIF SSD254.14 et la carte physique du locus *SKr*. (A) : Carte génétique du locus *SKr* sur le chromosome 5BS dans la population HIF SSD254.14. (B) : Carte physique du locus *SKr*. (C) : Colinéarité avec les gènes localisés sur les chromosomes 1, 2 et 12 du riz. Les 11 gènes du riz sur les chromosomes 1, 2 et 12 du riz sont annotés comme suit: (1) *Os01g14180*: *expressed protein*; (2 a,b,c) *Os02g13990*: *U2 small nuclear ribonucleoprotein A (U2A)*; (3) *Os12g44250*: *vesicle-associated membrane protein*; (4) *Os12g44240*: *N-acetylglucosaminyltransferase*; (5 a,b) *Os12g44220*: *ATPase*; (6) *Os12g44210*: *ATPase, AAA family domain containing protein*; (7) *Os12g44190*: *ATPase 3*; (8) *Os12g44180*: *nodulin*; (9) *Os12g44170*: *pentatricopeptide*; (10 a,b,c) *Os12g44160*: *oxidoreductase*; et (11 a,b) *Os12g44150*: *plasma membrane ATPase*. En gris les autres gènes présents à l'extrémité du chromosome 12L.

III. Discussion

La disponibilité d'une large population de cartographie permettant de construire une carte génétique fine du locus cible représente l'une des étapes clés d'un projet de clonage positionnel. Pour ce faire nous avons dès le début du projet initié le développement de trois populations (MP6 x Ct, SSD226 x Ct et SSD280 x Ct) qui devaient permettre de phénotyper et génotyper le locus finement et de nous affranchir de la population initiale MP98 x Ct et de ses aléas. Malheureusement, nous avons dû faire face à un problème de perte totale de polymorphisme entre les parents, lié à l'origine du matériel végétal, puisque la lignée Courtot que nous avons utilisée pour les nouveaux croisements s'est avérée légèrement différente de celle employée pour la création de la population MP98 x Ct en 1998. Le fait que Ct soit une variété inscrite au catalogue français dans les années 1974, devait garantir son homogénéité. En principe, il était possible d'éviter un tel problème par la conservation et la propagation isolée des parents ayant servi à faire les croisements de départ. Nous avons puis employé par défaut la variété Courtot utilisée à l'échelle du laboratoire pour développer les nouvelles populations (2004/2005). Cette expérience malheureuse qui nous fait perdre au moins une année de travail, illustre la difficulté de travailler sur des lignées utilisées également dans des programmes de sélection dont les exigences de pureté sont moindres que celles requises pour un projet d'analyse moléculaire et de clonage positionnel. Il est donc indispensable que toutes les lignées utilisées dans des projets moléculaires soient maintenues de façon spécifique et séparées des autres dans une station de recherche. C'est le cas dans notre laboratoire depuis.

Nous avons pu réagir assez rapidement en exploitant des individus de la population SSD qui par définition portaient les polymorphismes dont nous avons besoin pour continuer le projet à une échelle plus fine. Le choix des individus qui ont servi à développer les nouvelles populations était principalement déterminé par leur composition allélique dans la partie distale du chromosome 5BS. Les SSD individus 355, 524 et 566 qui ont servi à créer les populations de croisement ont été sélectionnés car leur composition allélique sur le chromosome 5BS permettait d'exploiter la totalité des marqueurs cartographiés et parce qu'ils possédaient un phénotype bien contrasté (croisable vs non croisable). Parmi les parents croissables, la SSD355.3 possédant les allèles de Ct sur les bras chromosomique 5AL et 5BL paraissait plus intéressante que les SSD355.1 et SSD355.2 qui sont hétérozygotes au locus *Kr1* et que la SSD524 (1, 2 et 3) qui possède l'allèle croisable sur le chromosome 5BL. Par contre, la SSD566 "non croisable" n'était pas forcément optimale car elle possède l'allèle croisable au locus *Kr1*. Cependant, notre choix était gouverné par la nécessité de trouver

un individu bien contrasté en phénotype et en génotype avec les SSD355 et SSD524. SSD566 présente un manque complet (0%) d'aptitude au croisement avec le seigle ce qui démontre que l'effet de *Kr1* dans les populations issues des croisements (SSD355 x SSD566) et (SSD524 x SSD566) peut être négligé.

Les SSD 254, 373, 508 et 511 qui ont servi à créer les populations d'autofécondation étaient les seuls individus hétérozygotes au locus *SKr* et aux autres locus au voisinage. Dans ce cas, le choix de la population de cartographie s'est porté sur la lignée SSD254 qui permet d'exploiter le plus grand nombre de marqueurs autour du locus *SKr*. Nous savions par ailleurs que les 4 SSD hétérozygotes portaient l'allèle du parent croisable MP98 au locus *Kr1*. Le fait que ces 4 individus présentent un phénotype "non croisable" très clair démontrait que l'allèle croisable au locus *Kr1* n'était pas en mesure de provoquer des ambiguïtés lors du phénotypage (croisable ou non croisable) et confirmait l'effet très faible de ce locus dans la population MP98 x Ct à l'image de la population Ct x CS (LAMOUREUX *et al.* 2002; TIXIER *et al.* 1998).

Grâce à la population SSD254.14 qui a été bien caractérisée pour le phénotype, nous avons confirmé la position très proche de *SKr* par rapport aux marqueurs cfb382, cfb306 et cfb341. Cette population représente maintenant une base, que nous estimons solide, pour localiser *SKr* sans ambiguïté entre deux marqueurs flanquant le gène. Nous sommes donc en position désormais de sélectionner les recombinants dans une très large population de cartographie génétique fine afin de déterminer précisément la localisation de *SKr* sur la carte génétique et la carte physique. La taille de la population SSD254.14 (223 individus) bien que nous ayant permis d'identifier des recombinants entre les marqueurs proches de *SKr* pourrait s'avérer limitante dans les dernières étapes de clonage et nous laisser avec plusieurs gènes candidats coségrégeant avec *SKr*. L'estimation de la taille de la population nécessaire pour isoler le gène *SKr* par clonage positionnel nécessite l'établissement précis de la relation entre la distance génétique et la distance physique au locus *SKr*. La liaison entre les deux contigs physique de 300 kb et 120 kb par de nouveaux BAC permettra d'utiliser des modèles statistiques conçus pour le calcul de la taille d'effectif nécessaire pour isoler un gène par clonage positionnel. En utilisant le modèle de DINKA *et al.* (2007) qui tient compte de la densité en marqueurs moléculaires disponibles dans l'intervalle cible et du taux de recombinaison local (R , kb/cM ou gènes/cM) entre deux marqueurs flanquant la cible, il sera possible d'ajuster les tailles des populations. Chez le blé, on sait que les taux de recombinaison sont plus importants dans les parties distales des bras chromosomiques que sur les parties proximales et que des variations locales peuvent être importantes

(AKHUNOV *et al.* 2003a; AKHUNOV *et al.* 2003b; DVORAK and CHEN 1984; SAINTENAC *et al.* 2009; THUILLET *et al.* 2004). Il faut en principe moins d'individus pour cloner un gène dans les parties distales, ce qui est le cas de *SKr*. Par conséquent la taille de la population nécessaire pour sélectionner les recombinants ne devrait pas être très importante. Bien que n'ayant pas tous les paramètres en main pour appliquer une équation complexe, nous pouvons tenter d'estimer un ordre de grandeur de la population idéale en nous basant sur la relation observée entre les marqueurs cfb382 et cfb306 (25 kb pour 0.2 cM i.e. $R_{\text{local}} = 125\text{kb/cM}$). En extrapolant cette relation pour encadrer le locus *SKr* sur une distance de 2 cM (250 kb), 1 cM (125 kb), 0.5 cM (62.5 kb) ou 0,2 cM (25 kb), la formule simple de DURRETT *et al.* (2002) prévoit un nombre de gamètes informatifs à génotyper d'environ 240, 480, 960 ou 2400 gamètes, respectivement. Le nombre de gamètes à génotyper dans une population F_2 est égal à deux fois le nombre des plantes à tester, lorsque l'on peut distinguer les allèles dominants des allèles hétérozygotes. Puisque ce n'est pas le cas au locus *SKr* actuellement, nous utiliserons un nombre des plantes F_2 identique à celui des gamètes pour nous éviter d'avoir à tester le phénotype pour les individus recombinants en génération F_3 . Nous avons actuellement 3000 grains en moyenne pour les différentes populations et sommes donc prêts, du côté du matériel végétal pour achever le clonage de *SKr*.

Actuellement, l'inhibition dominante de l'aptitude au croisement avec le seigle (RILEY and CHAPMAN 1967, cette étude) empêche de distinguer la composition homozygote *SKrSKr* de la composition hétérozygote *SKrskr* dans une population ségrégante. L'identification de la composition allélique du gène *SKr* nécessitera de réaliser le phénotypage d'individus (~20) de type F_3 (F_7 en réalité) issus des 4 individus recombinants (63, 100 108 et 116, Figure 40) à la génération suivante. Cette analyse nous permettra de déterminer la position de *SKr* par rapport aux marqueurs cfb306 et cfb382. Trois cas peuvent se présenter :

(1) Si une partie des descendants des individus 63, 108 et 116 hétérozygotes au locus cfb341 ségrègent dans la génération suivante cela signifiera que *SKr* était à l'état hétérozygote dans ces individus et que le gène est donc situé entre cfb306 et gwm234.

(2) Si tous les descendants des individus 63, 100, 108 et 116 sont non croisables (donc A pour les individus d'origine), le gène sera situé entre cfb382 et cfb341.

(3) Si les descendants de l'individu 100, hétérozygote pour cfb382, ségrègent pour la l'aptitude au croisement cela indiquera que le gène est situé en deçà de cfb306. Dans ce cas, un marqueur proximal sera nécessaire pour encadrer le gène. Nous sommes actuellement en train d'en développer à partir du BAC 2163O14 (*cf.* Paragraphe suivant).

Vers la cartographie fine de nouveaux marqueurs flanquant *SKr* sur une population de grand effectif : Pour sélectionner des recombinants dans des intervalles flanquant le gène *SKr*, nous avons le marqueur gwm234 du côté distal. Du côté proximal, les marqueurs RFLP bcd873, fbb276 et GBR1541 sont génétiquement proches entre eux mais cartographiés assez loin de *SKr* tandis que les marqueurs cfb382 et cfb306 coségrègent avec le gène. Bcd873, Fbb276 et GBR1541 sont cartographiables sur la nouvelle population SSD254.14 et sont en cours d'analyse.

Par ailleurs, deux autres sondes RFLP sont en cours d'analyse de polymorphisme entre les parents MP98 et Ct pour tenter de se rapprocher du gène du côté proximal : U2A5B (F-5'GTCCCTGTTTTTCAGGACGAA3' et R-5'GAGCATACCAAACATGCCAGT3') et 2163O14-ctg46 (F-5'AGAATCATCGCATGGTGGCGT3' et R-5'GTCGTGGGTTGCAA GGTCTATGA3'). U2A5B (957 pb) et 2163O14-ctg46 (627 pb) qui correspondent à des parties de gènes annotés *U2 small nuclear ribonucleoprotein A* (Ctg101) et *expressed protein* (Ctg46), respectivement, sur la séquence partielle du clone BAC (2163O14) le plus proximal. Si U2A5B et 2163O14-ctg46 s'avèrent cartographiables, ils seront aussi utiles pour cribler de nouveau la banque BAC de CS afin d'identifier de nouveaux BACs en amont du BAC 2163O14 qui pourront à leur tour être utiles pour identifier un marqueur proximal.

Du côté distal, le clone BAC 1731I01 (120 kb) pourra également être utilisé en séquençage pour dériver des nouveaux marqueurs plus proche du gène dans la nouvelle population et voir s'il y a des gènes supplémentaires sur ce clone issu du chromosome 5B par rapport aux 3 gènes identifiés sur le BAC partiellement séquencé 317L24 qui provenait du 5D. Pour le moment, nous ne pouvons pas exclure que *SKr* soit porté par le BAC 1731I01. Cependant, il semble que le gène *SKr* soit plutôt en amont du gène *plasma membrane ATPase1* correspondant à GBR0233 qui a recombiné avec *SKr* dans la population MP98 x Ct.

Différentes populations sont exploitables pour la cartographie précise de *SKr* : L'augmentation de la taille de population de cartographie à 3000 ou 4500 individus est faisable pour la population d'autofécondation SSD254.14. En effet, deux autres plantes sœurs SSD254.13 et SSD254.15 issus du même épi de la lignée F₅ SSD254 sont disponibles pour atteindre un effectif de cette taille. Par contre, l'individu ayant servi à créer la population d'autofécondation SSD254.1 ne semble pas idéal car il a montré une aptitude au croisement intermédiaire avec le seigle (20% et 45% pour deux épis testés).

Si besoin, les populations de croisements (SSD355 x SSD566) et (SSD524 x SSD566) peuvent aussi se révéler avantageuses car elles permettent d'exploiter tous les marqueurs précédemment cartographiés dans la population recombinante MP98 x Ct. Nous pourrions revenir à ces populations si une difficulté se présente pour identifier deux marqueurs flanquants dans la population d'autofécondation SSD254.14 puisque les deux marqueurs SSR gwm234 (distal) et gpw4098 (proximal) peuvent être utilisés pour sélectionner les recombinants dans ces populations. L'inconvénient de l'utilisation de ce couple de marqueurs est qu'ils sont assez éloignés sur la carte génétique (31.1 cM environ) et que le nombre de recombinants qui pourront être sélectionnés dans un grand effectif risque ainsi d'être assez élevé. Par conséquent, le phénotypage serait une opération laborieuse et au détriment du nombre d'épis testé par plante.

Vers la construction des cartes physiques du locus SKr dans les génotypes croisables et non croisables : Nous avons actuellement construit deux contigs physique de 300 kb et 120 kb (Figure 41) à partir de clones BAC de la variété "croisable" Chinese Spring et nous comptons achever la carte physique dans les mois prochains. Il serait avantageux de pouvoir construire également une carte physique dans un génotype non croisable pour comparer le contenu en gène des deux haplotypes et déterminer par exemple si des délétions sont à l'origine du phénotype dans Chinese Spring. Pour le moment, la banque BAC pour le parent Courtot non croisable n'est pas disponible (en cours de construction en collaboration avec H. Bergès au CNRGV), alors que la banque BAC de la variété Renan également "non croisable" est disponible et peut être criblée avec nos marqueurs. Il faut cependant signaler que l'effet de *SKr* n'a pas encore été caractérisé pour la variété Renan "non croisable" et qu'il serait essentiel de vérifier que *SKr* possède un effet majeur sur l'inhibition d'aptitude au croisement avec le seigle dans cette variété. Une fois que *SKr* sera localisé précisément au niveau d'un seul clone BAC, les BAC correspondants de Chinese Spring et de Renan pourront être complètement séquencés pour identifier les gènes candidats.

**5^{ème} Partie : Evaluation des Marqueurs cfb306
et cfb341 Pour la Sélection de *SKr***

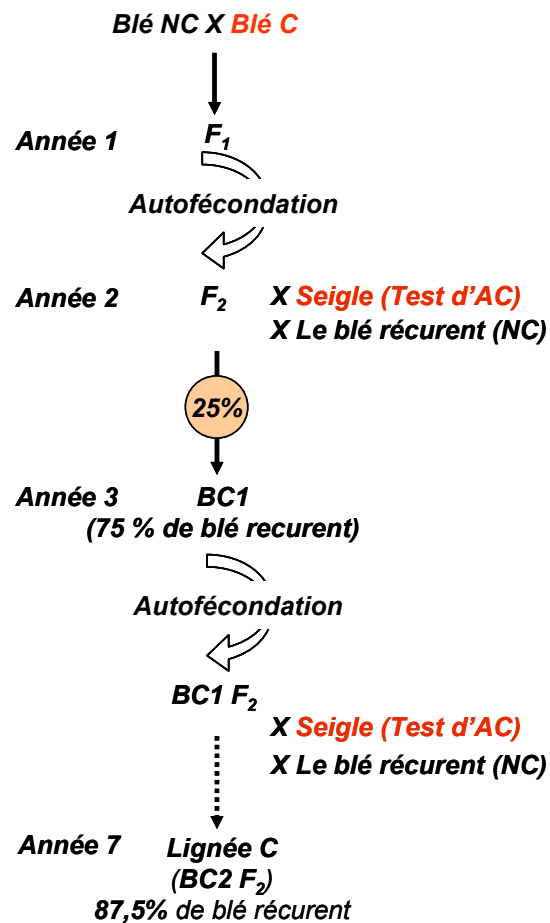


Figure 42 : Schéma d'introduction de l'aptitude au croisement par la méthode de backcross sans utilisation des marqueurs moléculaires (C) : croisable, (NC) : non croisable, (BC) : backcross, (AC) : aptitude au croisement.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Lignées parentales

La lignée de substitution Courtot (5B FukuhoKomugi), nommée ultérieurement Ct(5B FK), résulte du remplacement du chromosome 5B de la variété française non croisable Courtot par celui-ci de la variété japonaise croisable FukuhoKomugi (GAY and BERNARD 1994). Ainsi, l'aptitude au croisement de cette lignée provient du remplacement des allèles non croisables de Ct par ceux croisables de la variété FukuhoKomugi.

Dans le cadre des programmes d'obtention de triticales primaires conduits dans l'unité (A. Bougenne) et par le GIE Triticale, des gènes d'aptitude au croisement ont été introduits dans plusieurs lignées de blé français. Ainsi, les lignées françaises non-croisables (Genesis, Balthazar, Altria, Oratorio, FD92017 et Ornicar) ont été utilisées dans un croisement avec la lignée de substitution Ct(5B FK) pendant les années 1997-1998. Ces lignées montrent de bonnes caractéristiques agronomiques qui peuvent être un potentiel intéressant à introduire dans le pool de gènes de triticales.

1.2. Evaluation des descendance

L'aptitude au croisement a été introduite (Figure 42) à partir de la lignée de substitution Ct(5B FK) dans les blés français par la méthode de backcross. Deux croisements avec le parent non croisable récurrent suivis d'une autofécondation à chaque fois (l'inhibition d'aptitude au croisement est dominante i.e. la F_1 est non croisable) ont été effectués pour créer les lignées croisables (Figure 42). Les plantes F_2 issues de la F_1 subissent deux croisements simultanés, le premier avec le seigle pour caractériser le phénotype et sélectionner les descendance croisables et le second avec le parent récurrent non croisable (Figure 42). A chaque étape de sélection et pour chaque variété, 12 plantes F_2 ont été testés pour leur aptitude au croisement avec le seigle (var. Dankowskie Nowe) pour avoir au moins un individu croisable avec une probabilité supérieure à 96%.

Finalement, les descendance croisables issues de ce processus ont été validées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (var. Dankowskie Nowe) pendant deux saisons consécutives, 2002/2003 en serre et 2003/2004 en pépinière (A. Bouguennec, non publié). Onze lignées croisables issues de différents croisements (Tableau 22) ont été évaluées avec les marqueurs cfb306 et cfb341.

Tableau 22 : 11 lignées croisables issues de croisements entre des blés français non croisables et la lignée de substitution croisable Ct(5B FK).

Croisements	Progénies
Genesis x CT (5B FK)	01BB19-1-5
	01BB19-4-3
	01BB19-4-4
Balthazar x CT(5B FK)	01BB11-3-2
	01BB11-3-4
	01BB12-1-2
Oratorio x CT (5B FK)	01BB15-2-1
Altria x CT (5B FK)	02BB1-2-1
FD92017 x CT (5B FK)	02BB3-1-1
	02BB4-4-1
Ornicar X CT (5B FK)	02BB5-2-1

L'aptitude au croisement avec le seigle var. Dankowskie Nowe a été estimée pour chaque lignée en prenant en compte le meilleur résultat en serre et le meilleur résultat en pépinière puis l'aptitude au croisement a été exprimée en moyenne.

2. Marqueurs utilisés

Les marqueurs SSR cfb306 et cfb341 complètement liés au locus *SKr* ont été testés sur les 11 individus (Tableau 22) afin d'évaluer leur utilité pour la sélection assistée par marqueurs. La révélation du type d'allèle pour tous les parents des croisements ainsi que pour les 11 descendances a été réalisée par migration sur gel d'acrylamide 6% pendant 90 minutes avec un voltage constant de 2000 volts. L'extraction d'ADN, les conditions de PCR et la révélation sur gel d'acrylamide ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment (*cf.* 2^{ème} Partie).

3. Evaluation du polymorphisme sur une collection de blés

Pour bien mettre en évidence l'utilité de deux marqueurs cfb306 et cfb341, les taux de polymorphisme ont été évalués sur une collection de variétés et blés de pays (Landraces) d'origine diverse : France (14 variétés), Chine (19 variétés. and 6 Landraces), Inde (1 variété), Japon (12 variétés), Mongolie (1 variété), Pakistan (2 variétés) et Algérie (11 variétés). Tous sont des blés hexaploïdes sauf ceux provenant d'Algérie qui comprennent 6 blés hexaploïdes (*Triticum aestivum* L.) et 5 blés tétraploïdes (*Triticum turgidum* L.). Le test de polymorphisme a été réalisé en même temps que les 11 individus croisables testés et leur parents (*cf.* ci-dessus).

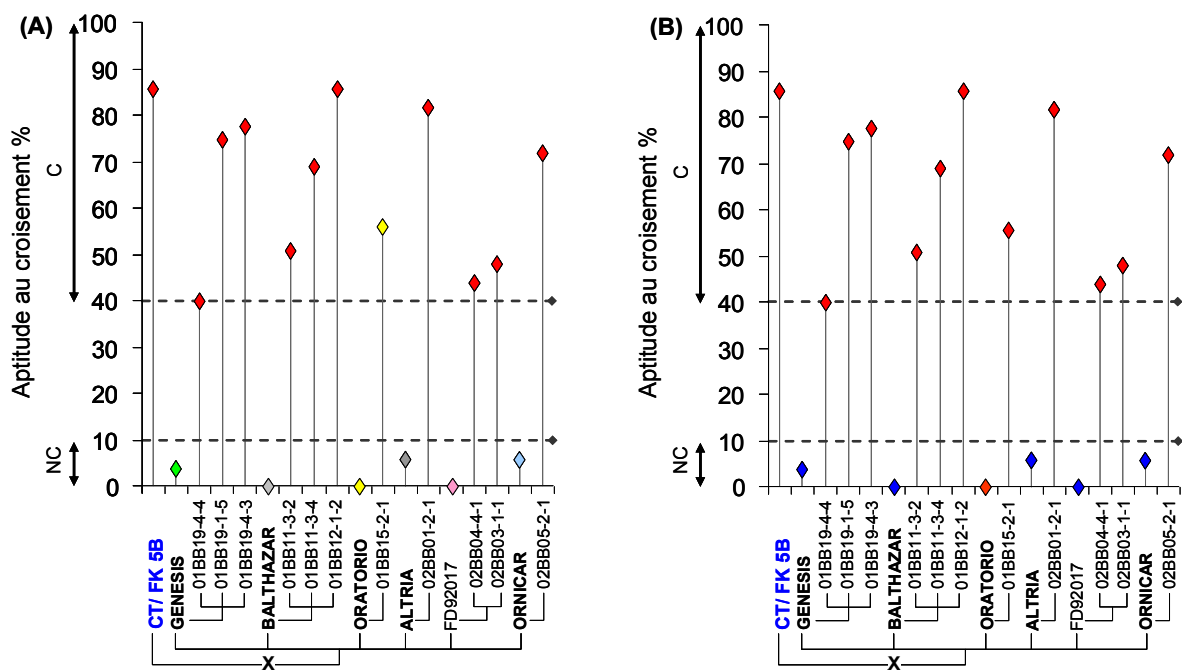


Figure 43 : Représentation graphique du phénotype et du génotype des parents et des descendance de différents croisements avec la lignée de substitution Ct(5B FK). (A) : génotypage avec le marqueur cfb306. (B) : génotypage avec le marqueur cfb341. L'aptitude au croisement (en %) est représentée sur l'axe Y alors que les lignées parentales et les descendance croissables de chaque croisement sont présentées sur l'axe X. Les points colorés représentent les différents allèles obtenus pour chaque marqueur. (C) : croissable. (NC): non croissable.

II. Résultats

Onze descendance de blé croisables issues de croisements entre 6 variétés françaises non croisables et une lignée de substitution croisable portant le chromosome 5B de la variété japonaise FukuhoKomugi (*cf.* matériel et méthode pour le schéma de production) ont été testées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (Figure 43). L'évaluation du phénotype selon les mêmes critères que ceux utilisés pour les analyses génétiques sur *SKr* montrent que les 11 descendance entrent dans la catégorie croisable (>40%) et que les lignées parentales françaises d'origine ont de très faibles taux d'aptitude au croisement (<10%, Figure 43) *i.e.* du même ordre que ceux observés pour le parent Ct utilisé dans notre étude.

L'aptitude au croisement observée dans la lignée de substitution Ct(5B FK) ainsi que dans les descendance testées provient uniquement du chromosome 5B. Par conséquent, l'un des deux gènes d'aptitude au croisement avec le seigle identifiés sur ce chromosome *i.e.* *KrI* (5BL) ou *SKr* (5BS) doit être à l'origine du caractère d'aptitude au croisement dans ces lignées. Pour déterminer s'il s'agit de *SKr*, les marqueurs *cfb306* et *cfb341* complètement liés à *SKr* ont été testés sur les différentes descendance. Les résultats obtenus avec les deux marqueurs (Figure 43) montrent une association complète entre l'allèle croisable aux locus *cfb306* et *cfb341* et l'aptitude au croisement avec le seigle, à l'exception d'un individu (01BB15-2-1 dans le croisement Oratorio x Ct(FK 5B) qui suggère une recombinaison entre *cfb306* et le phénotype (Figure 43A). Le non polymorphisme entre les parents de cet individu (Oratorio et Ct(FK 5B)) a empêché de caractériser le type d'allèle au locus *cfb341*. Cependant, les résultats du phénotypage pour cet individu ont montré une variabilité s'étendant de 6% à 66%. Il sera nécessaire de confirmer ces résultats afin d'identifier l'origine de l'aptitude au croisement de cet individu (*SKr* ou *KrI*).

Ainsi, nos résultats démontrent que le caractère d'aptitude au croisement introduit par la substitution du chromosome 5B de FukuhoKomugi provient du locus *SKr*. Les deux marqueurs SSR *gwm213* et *gwm371* liés à *KrI* sont en cours d'analyse pour bien confirmer que comme dans le cas de Courtot, seul *SKr* joue un rôle majeur dans l'aptitude au croisement de la lignée FukuhoKomugi. Finalement, nos résultats indiquent aussi que *cfb306* et *cfb341* représentent une source potentielle de marqueurs pour l'introduction de l'allèle croisable

Tableau 23 : Caractérisation du type d'allèle aux locus cfb306 et cfb341 sur une collection de 66 blés provenant de plusieurs pays. La lettre pour un marqueur donnée montre le type d'allèle. Les blés sont classés en ordre descendant selon la taille d'allèle obtenue sur gel d'acrylamide au locus cfb306. (CHN) : Chine, (DZA) : Algérie, (FRA) : France, (JPN) : Japon, (PAK) : Pakistan, (IND) : Inde, (MNG) : Mongolie.

Accession	cfb306	cfb341	Pays	Variété/ Landraces	<i>T.aestivum</i> / <i>T. durum</i>	Accession	cfb306	cfb341	Pays	Variété/ Landraces	<i>T.aestivum</i> / <i>T. durum</i>
TIBET 8	A	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Qing chun 5	I	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Da mai zi	B	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Feng kang 6	I	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Jing zhou 1	B	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Xin dong 5	I	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Shi jia zhuang 407	B	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Fang tou hong mang	I	A	CHN	Land.	<i>aestivum</i>
Feng shou 1	B	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Dong nong 101	I	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Hedab	B	A	DZA	Var.	<i>aestivum</i>	Bei jing 10	I	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
He po liu jiao mai	C	A	CHN	Land.	<i>aestivum</i>	Chuan mai 8	I	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
QUAD	C	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	Mahon Demias	I	A	DZA	Var.	<i>aestivum</i>
ORVANTIS	C	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	Ain Abid	I	A	DZA	Var.	<i>aestivum</i>
FD92017	C	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	Florence aurore	I	A	DZA	Var.	<i>aestivum</i>
Capetit	D	A	DZA	Var.	<i>durum</i>	ARZ	I	A	DZA	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 81	D	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Pusa 62	I	A	IND	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 69	D	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Orhon	I	A	MNG	Var.	<i>aestivum</i>
Chinese Spring	E	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	TALISMAN	J	A	FRA	Var.	<i>aestivum</i>
Xiao hua yao	E	A	CHN	Land.	<i>aestivum</i>	ORATORIO	J	A	FRA	Var.	<i>aestivum</i>
Jegger	E	B	DZA	Var.	<i>aestivum</i>	Fei mai	K	AB	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 33	E	B	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Bai shan ge da	K	A	CHN	Land.	<i>aestivum</i>
Fukuho Komugi	E	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Ct (2005)	K	A	FRA	Var.	<i>aestivum</i>
Jin mai 4058	F	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Norin 29	K	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>
Da tou qiu	F	B	CHN	Land.	<i>aestivum</i>	Norin 35	K	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>
ALTRIA	F	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	Norin 51	K	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>
BALTHAZAR	F	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	C518	K	C	PAK	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 68	F	B	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Norin 18	L	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 52	F	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Norin 16	L	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>
Norin 20	F	A	JPN	Var.	<i>aestivum</i>	Hedba	M	A	DZA	Var.	<i>durum</i>
Kashmir2	F	A	PAK	Var.	<i>aestivum</i>	MBB	M	A	DZA	Var.	<i>durum</i>
RABT96-65	G	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	An hui 3	N	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
FD97003	G	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	BIDI 17	N	A	DZA	Var.	<i>durum</i>
GENESIS	G	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>	Yun mai 27	O	AB	CHN	Var.	<i>aestivum</i>
Gan mai 8	H	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	Waha	O	A	DZA	Var.	<i>durum</i>
Tai shan 1	H	B	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	VM202	P	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>
Liao chun 5	H	A	CHN	Var.	<i>aestivum</i>	ORNICAR	Q	B	FRA	Var.	<i>aestivum</i>
Renan	H	B	FRA	Var.*	<i>aestivum</i>	Hei he dang di zhong	R	A	CHN	Land.	<i>aestivum</i>

skrskr dans les programmes de production de triticales primaire ou pour le croisement du blé avec des espèces voisines.

L'analyse des résultats de génotypage avec les 2 marqueurs indique un taux de variabilité allélique très différent entre les deux marqueurs. Pour cfb306, 5 allèles différents ont été observés pour les 6 variétés de blé français non croisable tandis que pour cfb341 deux allèles seulement ont été détectés (Figure 43). Ceci suggère un fort taux de polymorphisme pour cfb306. Pour confirmer cette observation nous avons testé les deux marqueurs sur une collection de 66 variétés et Landraces (Tableau 23). Comme prévu, le marqueur cfb306 s'est montré extrêmement polymorphe en détectant 18 allèles différents alors que le marqueur cfb341 n'a détecté que 2 allèles seulement pour 65 blés et un troisième pour un blé provenant du Pakistan (Tableau 23). Il est intéressant de noter que le taux de polymorphisme reste élevé même à l'intérieur de groupe de blé provenant de la même origine géographique. Ainsi, on détecte 8 allèles différents parmi les 14 blés français, 11 dans 25 blés chinois, 5 dans 12 blés japonais, 2 dans deux blés pakistanais et 3 (*T. aestivum*) et 4 allèles (*T. durum*) dans 6 et 5 blés algériens, respectivement (Tableau 23).

Ces résultats indiquent que cfb306 peut représenter un outil moléculaire puissant pour caractériser les allèles au locus *SKr* sur des lignées parentales dans un programme de sélection du caractère d'aptitude au croisement assistée par marqueur.

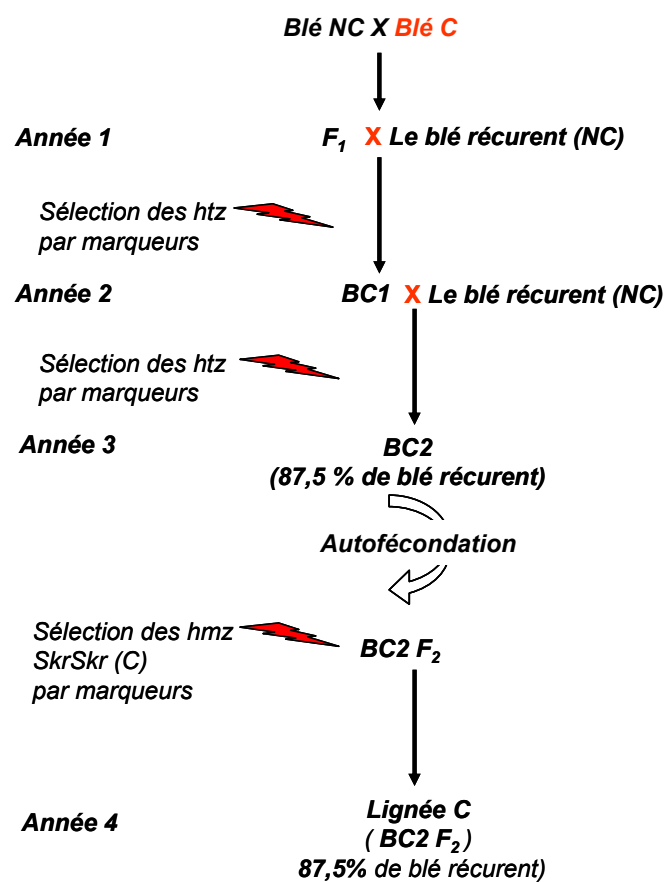


Figure 44 : Schéma d'introduction de l'aptitude au croisement par la méthode de backcross à l'aide des marqueurs moléculaires (C) : croisable, (NC) : non croisable, (BC) : backcross, (AC) : aptitude au croisement, (htz) : hétérozygote, (hmz) : homozygote.

III. Discussion

L'introduction des gènes d'aptitude au croisement dans des variétés élités de blé « non croisables » présente un intérêt pour les programmes de production de triticales primaires et pour des croisements avec les espèces voisines afin d'augmenter la diversité génétique dans de nouvelles variétés de blé. Les espèces voisines de blé constituent un réservoir riche en gènes pour l'amélioration du blé (FRIEBE *et al.* 1996; JIANG *et al.* 1994) et de nouveaux gènes provenant d'espèces voisines ont ainsi été transférés avec succès pour améliorer la résistance génétique du blé aux stress biotiques, tels que le virus de nanisme jaune de l'orge (BYDV) (MCGUIRE *et al.* 1995) ou l'oidium *Erysiphe graminis* avec les gènes *Pm4* et *Pm21* transférés à partir du seigle et *Haynaldia villosa*, respectivement (YUAN *et al.* 1998) et à de nombreux insectes telle que *Mayetiola destructor* (Hessian fly) (FRIEBE *et al.* 1990) et le Puceron (MARAIS *et al.* 1994) ainsi qu'aux stress abiotiques (salinité, froid, sécheresse) (FEDAK 1985).

Pour le moment, l'introduction de l'allèle croisable dans le blé a été souvent réalisée par la méthode des backcross sans utilisation des marqueurs. Celle-ci est longue et laborieuse puisque l'aptitude au croisement avec le seigle est récessive, et une génération d'autofécondation est donc requise pour identifier les individus portant l'allèle croisable avant de réaliser le backcross suivant (Figure 42). De plus, pour éviter de perdre une génération pendant le transfert de l'allèle croisable, la méthode nécessite que toutes les plantes F₂ soient testées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (12 par génération, seulement 25% d'entre eux se révéleront croisables) en même temps que le croisement avec le parent de blé récurrent « non croisable » est effectué. Le processus prend en moyenne 7 années et les résultats ne sont pas toujours garantis. L'utilisation de marqueurs liés au gène d'aptitude au croisement de type *SKr* peut être extrêmement efficace pour accélérer le processus des backcross. En effet, les marqueurs doivent permettre d'identifier les individus croisables sans passer par une génération d'autofécondation et sans tester l'aptitude au croisement avec le seigle (Figure 44). Le processus dans ce cas serait raccourci de moitié (4 ans) ce qui est essentiel pour les sélectionneurs.

Nos résultats montrent que le marqueur cfb306 très proche du gène *SKr* possède tous les caractéristiques d'un marqueur efficace pour introduire l'allèle d'aptitude au croisement dans le germplasma de blé via la sélection assistée par marqueurs (SAM). En tant que SSR, le marqueur cfb306 permet la réalisation du génotypage à haut débit sur séquenceur capillaire et son haut niveau de polymorphisme allélique doit également permettre son application sur un grand nombre de variétés de blé. En effet, l'efficacité de l'introduction de l'allèle croisable

dans des variétés élités de blé dépend de la capacité à caractériser la composition allélique de la lignée réceptive aux gènes d'aptitude au croisement, cfb306 et des marqueurs du même type pour les autres locus (e.g. *Kr1*, Graham Moore, communication personnelle) seront extrêmement utiles à cet égard. Finalement, cfb306 s'est révélé co-dominant sur les 66 blés testés sauf un seul, VM202 (absence d'amplification) ce qui indique que cfb306 doit permettre l'identification des hétérozygotes à sélectionner après chaque backcross avec le parent récurrent non croisable (Figure 44).

La lignée croisable 01BB15-2-1 issue du croisement Oratorio x Ct(FK 5B) a montré de la recombinaison entre cfb306 et l'aptitude au croisement. La variation des résultats du phénotypage observés sur cet individu (6% à 66%) nécessite une confirmation ultérieure du degré d'aptitude au croisement. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'aptitude au croisement dans cet individu provienne de l'autre gène d'aptitude *Kr1* et non pas de *SKr*. L'analyse en cours des lignées avec les marqueurs SSR proches de *SKr* devraient nous apporter une réponse. De plus, ces analyses nous permettront peut être de déterminer également si l'inaptitude au croisement des six blés français étudiés provient de *SKr* ou de *Kr1*. En effet si nous identifions des individus croisables qui possèdent encore l'allèle du parent non croisable au locus *Kr1*, cela signifiera que *SKr* est le gène majeur responsable de l'inaptitude.

Nos résultats et les études antérieures suggèrent que les gènes d'aptitude au croisement chez le blé montrent un niveau élevé de variabilité allélique. Par exemple, FALK and KASHA (1983) ont montré que Atlas66 et Hope possèdent un allèle de *Kr1* plus fort que celui-ci de Cheyenne et Chinese Spring. Pour *SKr*, nous suggérons que FukuhoKomugi ainsi que Chinese Spring possèdent un allèle faible qui peut être détecté seulement par l'utilisation des lignées ditélosomiques (SITCH *et al.* 1985) et que la plupart des variétés de blés européens non croisables, comme Ct et possiblement les blés français testés ici, portent un allèle inhibiteur fort au locus *SKr*. Au contraire, Ct porterait un allèle faible de *Kr1*. Le travail de clonage positionnel en cours pour le gène *Kr1* devrait nous aider dans le futur pour mieux analyser le niveau de variabilité de ce gène et de voir ainsi comment les deux gènes du chromosome 5B agissent sur l'aptitude au croisement du blé avec les espèces apparentées.

6^{ème} Partie : Conclusions et Perspectives

I. Conclusions

Les travaux réalisés pendant la thèse ont permis d'avancer significativement vers le clonage positionnel du gène *SKr* ayant un effet majeur sur l'aptitude du blé tendre au croisement avec le seigle. Le succès d'un projet de clonage positionnel repose sur le franchissement d'étapes clés telles que :

1. La possibilité de caractériser le phénotype de façon reproductible d'une expérience à l'autre en minimisant au maximum les erreurs expérimentales dues aux conditions climatiques et aux expérimentateurs. En effet, une erreur de phénotypage, en particulier dans les étapes finales de cartographie fine, peut engendrer une mauvaise localisation du gène dans un intervalle génétique et physique et ralentir d'autant le projet. L'aptitude au croisement du blé avec le seigle est loin d'être trivial à évaluer et nécessite une très bonne maîtrise de la castration des épis de blé et de la pollinisation croisée. La période de l'année pendant laquelle l'expérience est réalisée est également importante et les meilleurs résultats ont toujours été obtenus en serre au mois d'avril en condition de photopériode naturelle. Dans le cas de ce projet, le phénotypage, parfaitement maîtrisé au laboratoire, nous a permis d'observer de façon reproductible deux classes d'aptitude au croisement et de pouvoir ainsi traiter le gène comme un caractère mendélien en confirmant l'effet majeur de *SKr* initialement observé par une analyse QTL. La qualité du phénotypage qui a été obtenu pendant les différentes phases du projet, nous laisse croire que la localisation du gène sur les cartes génétiques est robuste. Ce résultat a permis de progresser significativement vers le clonage du gène.

L'une des raisons pour laquelle le phénotypage du caractère d'aptitude au croisement est parfois complexe est liée à son caractère multi génique. Bien que *SKr* se comporte comme un gène majeur dans la population MP98 x Ct, nous avons voulu tester la composition allélique aux deux autres locus majeurs d'aptitude au croisement *Kr1* (5BL) et *Kr2* (5AL). Les résultats ont confirmé que dans cette population, ils n'ont pas d'effets significatifs sur le phénotype et ont confirmé l'existence de variations alléliques importantes aux gènes d'aptitude au croisement dans les variétés de blé avec une aptitude au croisement élevée pour les variétés originaires d'Asie (Chinese Spring, FukuhoKomugi).

2. La construction d'une carte génétique dense en marqueurs facilement utilisables sur de larges effectifs.

Nous avons au cours de la thèse ajouté au total 13 nouveaux marqueurs sur la carte génétique de la population SSD initiale MP98 x Ct, dont 6 dans un intervalle de moins de 0.3 cM de part et d'autre du gène. Nous avons montré que la sélection des recombinants effectuée

avant ce travail de thèse avait été effectuée entre deux marqueurs gpw1072 et dl103 qui ne flanquaient pas le gène *SKr* mais étaient localisés en position proximale du gène. Cela a eu pour conséquence de minimiser les distances génétiques réelles au delà de ces marqueurs en position distale et d'introduire des erreurs potentielles de l'ordre des marqueurs dans cette région du fait du manque de recombinants. Ce problème pris en compte dès le démarrage des travaux avec le développement de nouvelles populations a pu être résolu en fin de thèse par l'utilisation de la population HIF SSD254.14 qui a pu être analysée rapidement avec les nouveaux marqueurs.

La densification de la région de *SKr* par de nouveaux marqueurs a été facilitée par l'exploitation des relations synténiques avec l'orge et le riz. Les relations synténiques complexes entre la partie distale du chromosome 5BS et le riz et l'absence de marqueurs géniques cartographiés génétiquement chez le blé dans cette région ont rendu difficile l'exploitation du riz dans un premier temps. Le développement d'une carte génétique d'EST dense chez l'orge en 2007 et l'accès à cette carte avant publication au travers d'une collaboration avec Nils Stein (IPK, Allemagne) nous a permis de contourner ce problème et de cartographier pour la première fois un marqueur (GBR0233) en position distale de *SKr*. GBR0233 a représenté un élément clé aboutissant à une série de résultats consécutifs importants:

- Un premier marqueur cartographié en position distale de *SKr*.
- La détermination précise de la région synténique du locus *SKr* sur le chromosome 12L de riz.
- La démonstration de la proximité des locus *SKr* et *GSP* et la possibilité d'utiliser des séquences de blé publiées au locus GSP-5B pour définir un nouveau marqueur (cfb306 très lié à *SKr*).
- L'initiation de la cartographie physique, le séquençage partiel des premiers BAC de Chinese Spring et l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques du 5B (cfb341 et cfb382) au locus *SKr*.

Ainsi, l'exploitation de la synténie avec l'orge a représenté une ressource essentielle pour la cartographie génétique fine dans une région ayant l'une des relations synténiques les plus complexes avec le riz.

3. La possibilité de construire une carte physique du locus dans une variété portant le gène d'intérêt.

La première banque BAC du génome complet de blé a été développée sur la variété de référence Chinese Spring (ALLOUIS *et al.* 2003). Cette variété choisie par la communauté internationale pour son intérêt dans le développement de lignées aneuploïdes est souvent décriée par les sélectionneurs pour son manque d'intérêt agronomique. Dans le cas du projet *SKr* elle est parfaitement adaptée pour les analyses génétiques puisqu'elle fait partie des rares variétés croisables avec le seigle (critère de choix également à l'époque). Cependant, Chinese Spring possédant l'allèle récessif de *skr* nous devons envisager une autre source de BAC pour isoler le gène au cas où l'absence d'inhibition résulterait d'une délétion du gène *SKr*. D'autres banques BACs sont disponibles pour des variétés non croisables telle que celle de la variété Renan et nous avons une banque de la variété Courtot en cours de construction au CNRGV.

L'accès à des banques BAC est primordial pour la réalisation d'un projet de clonage positionnel, mais l'outil le plus efficace reste une carte physique du génome. En effet, l'accès à une carte physique permet de réaliser des étapes de marche sur le chromosome de 500 kb à plus de 1Mb et réduit très significativement la durée d'un tel projet. Jusqu'à présent tous les projets de clonage positionnel de gènes chez le blé tendre ont duré en moyenne 8 à 10 ans. Depuis 5 ans, un consortium international, l'International Wheat Genome Sequencing Consortium, coordonne un programme de construction d'une carte physique des 21 chromosomes du blé tendre de la variété Chinese Spring. La stratégie suivie consiste à réaliser la carte de chacun des chromosomes individuellement en utilisant des banques chromosomes spécifiques (JANDA *et al.* 2004). Une première carte du plus grand des chromosomes, le 3B a été réalisée dans notre laboratoire en 2008 (PAUX *et al.* 2008) et les autres cartes sont en cours de construction. En ce qui concerne le 5B, le laboratoire de génétique et cytogénétique d'E. Salina à Novosibirsk (Russie) démarre actuellement la construction de la carte en collaboration avec notre groupe. En fonction de la vitesse à laquelle le clonage du gène progressera dans les mois qui viennent nous pourrions ou non profiter de cette collaboration.

4. La possibilité de réduire l'intervalle autour du gène à moins de 2cM avec des marqueurs flanquants.

Les nouvelles populations de cartographie fine (MP6 x Ct, SSD226 x Ct et SSD280 x Ct) développées dès le démarrage de la thèse (2004/2005) se sont malheureusement révélées inutiles du fait de la différence de polymorphisme entre le Courtot utilisé actuellement au laboratoire et celui-ci utilisé à l'origine. La conservation des parents qui ont servi à créer la

population de départ MP98 x Ct aurait pu nous éviter un tel problème et cette démarche de qualité dans un projet d'analyse moléculaire est désormais mise en place systématiquement dans les projets du laboratoire.

Grâce à l'exploitation des individus SSD ayant le fonds génétique du parent Courtot d'origine nous avons pu contourner le problème et développer de nouvelles populations qui semblent maintenant bien adaptées pour réaliser la cartographie génétique fine. Nous avons pu en toute fin de projet établir une première carte sur 233 individus de la population SSD254.14 en évaluant à la fois le phénotype et le génotype. Les résultats montrent que nous avons maintenant une base solide pour finaliser le clonage du gène *SKr*. Nous possédons plus de 1500 graines de la population HIF SSD254.14 et plus de 4500 graines si l'on prend en compte les autres populations issues du même individu hétérozygote (SSD254.13 et SSD254.15). La possibilité de cartographier finement le gène associée à la construction d'une carte physique bien avancée, nous permet de penser que le projet de clonage de *SKr* puisse aboutir très prochainement.

Finalement, l'un des autres résultats marquants du projet est le développement de marqueurs SSR très liés au gène *SKr*. Ceux-ci peuvent d'ores et déjà être utilisés par les sélectionneurs afin de réduire significativement le temps nécessaire pour introduire l'allèle croisable dans des variétés élites de blé. C'est déjà le cas pour un programme de sélection de triticales mené par la société Bioplante à qui nous avons déjà fourni le marqueur cfb306.

II. Perspectives

Les différentes ressources (marqueurs, populations, BACs) disponibles pour la cartographie génétique et physique au locus *SKr* doivent nous permettre d'identifier des gènes candidats dans la région cible. En termes de carte physique, il reste à faire la liaison entre les deux contigs physiques de 300kb et 120 kb dans la variété Chinese Spring. De nouveaux marqueurs sont en cours de développement pour effectuer de nouveaux criblages de la banque BAC de Chinese Spring et une banque BAC spécifique du chromosome 5B est en cours de construction dans le laboratoire de Jaroslav Dolezel dans le cadre du projet de construction de la carte physique du chromosome 5B. Elle pourra si besoin est être également criblée pour compléter la carte physique. Comme nous l'avons évoqué précédemment il serait intéressant, lorsque nous aurons réduit l'intervalle physique au minimum, d'établir un contig physique dans la variété non croisable. Une banque en pool de la variété Courtot est actuellement en cours de construction au CNRGV en collaboration avec H. Bergès dans le cadre du projet

européen TriticeaeGenome. Elle sera précieuse dans les dernières étapes du projet et nous permettra d'avoir accès à l'allèle dominant du gène *SKr*.

Une fois les gènes candidats identifiés, une étape de validation par transformation sera nécessaire. La transgénèse sur le blé hexaploïde est parfaitement maîtrisée au laboratoire (Equipe de P. Barret). Elle est réalisée par biolistique avec un protocole modifié qui permet l'obtention d'insertions simples. Actuellement trois variétés (Bobwhite, Courtot et Récital) sont transformées en routine et la transformation de blés tétraploïdes et diploïdes est en cours de validation. Dans le cas du gène *SKr* dont la composante dominante inhibe l'aptitude au croisement, la validation par transformation doit se faire sur une lignée portant l'allèle récessif *skrskr*. Cependant, le blé "croisable" de référence Chinese Spring utilisé dans notre étude a été classé parmi les blés présentant une faible efficacité de transformation (TAKUMI and SHIMADA 1997; P. Barret, communication personnelle) et nous devons envisager une autre alternative. L'une des solutions pourrait être l'utilisation du blé croisable MP98, lignée double haploïde issue du croisement "Ct *mono 5B* x CS". Cependant, nos résultats indiquent que MP98 porte encore une partie importante du fond génétique de CS, et il se pourrait qu'elle soit aussi récalcitrante à la transformation. Il serait plus avantageux d'utiliser un individu issu de la SSD MP98 x Ct qui a subi un backcross avec le parent Courtot qui lui est transformable à de bons taux. On pourra ainsi exploiter les individus SSD "croisables" identifiés lors du phénotypage sur la population recombinante MP98 x Ct (25 individus) et sur la population d'autofécondation SSD254.14 (43 individus). Au vu de nos résultats de phénotypage, les plantes transformées par le gène candidat *SKr* devraient présenter un taux maximum d'aptitude au croisement de 15% voire un manque complet d'aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe). Nous envisageons de réaliser des transformations avec un promoteur natif mais également un promoteur fort pour étudier si l'effet du dosage de l'allèle *SKr* sur l'efficacité d'inhibition. Une deuxième alternative pourrait consister en l'inhibition de l'allèle dominant dans Courtot par RNAi. La technique est également maîtrisée au laboratoire et pourrait apporter des résultats complémentaires pour la validation.

Une fois le gène identifié et validé, de nombreuses expériences pourront être mises en œuvre de façon à étudier l'expression spatio-temporelle du gène et réaliser des analyses de génomique comparée avec les gènes homologues d'autres espèces. Nous n'avons actuellement aucune idée de la présence et du rôle potentiel d'un gène orthologue chez le riz ou d'autre plantes modèles (*Brachypodium*, *A. thaliana*) mais ces aspects seront particulièrement intéressants à étudier.

Un autre aspect abordé de façon préliminaire dans cette étude est l'origine et l'évolution de l'inhibition de l'aptitude au croisement chez le blé. Nous avons discuté de l'origine asiatique de l'aptitude au croisement chez le blé tendre mais n'avons encore aucune donnée sur l'origine de ce système de contrôle chez les blés tétraploïdes et chez les diploïdes. Grâce aux marqueurs et prochainement au gène, nous pourrions aller étudier de plus près l'aptitude au croisement entre le blé tétraploïde (*T. durum*, AABB) et le seigle. Les marqueurs cartographiés en position très proches de *SKr* ont pu être amplifiés sur 5 blés tétraploïdes provenant d'Algérie. Le fait que ces marqueurs soient mono-locus suggère que l'amplification provienne également du chromosome 5B de *T. durum*. On pourra rechercher des populations tétraploïdes polymorphes pour ces marqueurs afin de confirmer leur localisation et effectuer des tests phénotypiques d'aptitude au croisement avec le seigle sur ces variétés. Nous pourrions également par la suite utiliser nos marqueurs sur des collections de blés issus des ressources génétiques et déterminer les fréquences alléliques au locus *SKr* pour réaliser des études d'association avec les taux d'aptitude au croisement. De nombreuses variétés provenant principalement d'Asie ont été caractérisées pour leur aptitude au croisement avec le seigle (SIRKKA *et al.* 1992; ZHENG-SONG *et al.* 1998). Certaines d'entre elles ont montré une bonne aptitude au croisement avec le seigle (>50%) et elles pourront être génotypées avec nos marqueurs. A l'inverse nous pourrions tester les variétés présentant les mêmes allèles que Chinese Spring et FukuhoKomugi pour leur aptitude au croisement avec le seigle. Ces analyses devraient nous aider à mieux comprendre l'origine et l'histoire du locus *SKr*.

Des études antérieures ont mentionné que l'aptitude au croisement du blé avec le seigle, *Hordeum vulgare* et *Hordeum bulbosum* est gouvernée par le même système génétique dont les gènes portés par le chromosome 5B (FALK and KASHA 1981; FALK and KASHA 1983; FEDAK and JUI 1982; SITCH *et al.* 1985). Dans notre dernière année d'étude (2009), nous avons réalisé une première expérience pour vérifier cette hypothèse pour le locus *SKr*. Nous avons utilisé la même variété Betzes (*H. vulgare*) testée par FEDAK and JUI (1982) et avons observé un manque complet d'aptitude lors du croisement entre Ct_{mono 5B}, SSD566 (non croisables avec le seigle) et Betzes tandis que MP98 et Chinese Spring montraient une aptitude au croisement allant jusqu'à 20%. Ces taux sont plus faibles qu'avec le seigle (95%) ce qui confirme les observations de FEDAK and JUI (1982) qui ont obtenu une aptitude maximum de 48.9% et de FALK and KASHA (1981) qui avaient observé 32.2% d'aptitude au croisement dans le cas CS x *H. bulbosum* comparé à 86.7% dans le cas CS x seigle. Ces analyses phénotypiques seront poursuivies et éventuellement étendues à des analyses génétiques pour confirmer l'hypothèse.

Au-delà de la caractérisation moléculaire du gène *SKr*, il sera nécessaire d'aborder les aspects physiologiques concernant le(s) site(s) d'action du gène d'inhibition du croisement interspécifique, *SKr*. Nous n'avons pas eu le temps de traiter cet aspect pendant la thèse et très peu de choses sont connues à l'heure actuelle pour ce qui concerne le blé. Cet aspect a été abordé au début des années 80 pour les gènes d'aptitude au croisement *Kr1* (5BL) et *Kr2* (5AL) (JALANI and MOSS 1980; JALANI and MOSS 1981) et les études ont indiqué que le site d'arrêt de croissance du tube pollinique du seigle se situait entre la base du style et le haut du sac embryonnaire. Il reste à déterminer si le gène *SKr* agit par le même mécanisme d'inhibition. La réalisation de telles expériences exige des compétences qui ne sont pas disponibles dans notre laboratoire actuellement. La perspective dans ce cas est soit d'acquérir les compétences, soit de nouer des collaborations avec une équipe qui maîtrise les techniques de cytologie et d'analyse de développement des tubes polliniques. Récemment, un laboratoire japonais a publié un résumé de poster sur la caractérisation de l'effet et le site d'action des gènes *SKr* et *Kr1*, (The 6th International Triticeae Symposium (6th ITS), 31 Mai – 5 Juin, 2009, P-52, Mishina K., l'Université de Chiba, Japon). Cette étude a d'une part confirmé nos résultats en détectant par analyse QTL un effet majeur au locus *SKr* (5BS), supérieur à celui du locus *Kr1* (5BL) dans la variété de blé Cheyenne et d'autre part a décrit une technique d'analyse du développement du tube pollinique par microscopie confocale. Nous allons contacter ce laboratoire pour lui proposer une collaboration entre nos deux équipes. Nous pensons aussi une fois que le gène et son expression auront été bien caractérisés, à la possibilité de générer des plantes transgéniques portant un gène rapporteur de type GFP sous contrôle du promoteur du gène ou un tag dans le transgène pour réaliser des analyses de son expression *in situ*.

Finalement, notre étude a démontré l'effet majeur de *SKr* et l'effet non-existant ou faible du gène *Kr1* suggérant que nos populations de cartographie ne soient pas idéales pour caractériser l'effet de *Kr1* et le comparer avec celui de *SKr*. L'une des difficultés majeures pour comparer l'effet des différents gènes, et notamment *SKr* et *Kr1* sur le chromosome 5B a été jusqu'à présent le manque de populations de cartographie génétiques puisque les études ont été menées le plus souvent sur des lignées aneuploïdes. Les groupes de G/ Moore (JIC, UK) qui clone le gène *Kr1* sur le chromosome 5BL (BERTIN *et al.* 2009) et le groupe japonais récemment identifié, ont également abordés la question au travers d'analyse de liaisons et nous souhaitons pouvoir échanger du matériel génétique avec eux. Il serait intéressant en particulier de créer de nouvelles populations de lignées ditelosomiques à partir des variétés non croisables Courtot, Hobbit, Hope et Cheyenne qui ont été utilisées dans les analyses

génétiques et de générer des populations en les croisant avec le même parent croisable Chinese Spring. Grâce aux avancées sur la caractérisation moléculaire de *SKr* réalisées dans ce projet et aux efforts des autres groupes nous espérons avoir très bientôt de nouveaux outils plus performants pour caractériser la base moléculaire de l'aptitude du blé au croisement avec le seigle, sujet qui occupe les chercheurs depuis plus de 70 ans maintenant.

Références

- ABBOTT, R. J., 1992 Plant Invasions, Interspecific Hybridization and the Evolution of New Plant Taxa. *Trends Ecol Evol* **7**: 401-405.
- AHMAD, F., and A. COMEAU, 1991 Production, Morphology, and Cytogenetics of *Triticum aestivum* (L) Thell X *Elymus scabrus* (R Br) Love Intergeneric Hybrids Obtained by Inovulo Embryo Culture. *Theor Appl Genet* **81**: 833-839.
- AKHUNOV, E. D., A. R. AKHUNOVA, A. M. LINKIEWICZ, J. DUBCOVSKY, D. HUMMEL *et al.*, 2003b Synteny perturbations between wheat homoeologous chromosomes caused by locus duplications and deletions correlate with recombination rates. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **100**: 10836-10841.
- AKHUNOV, E. D., A. W. GOODYEAR, S. GENG, L. L. QI, B. ECHALIER *et al.*, 2003a The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* **13**: 753-763.
- ALLOUIS, S., G. MOORE, A. BELLEC, R. SHARP, P. FAIVRE RAMPANT *et al.*, 2003 Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germplasm 'Chinese Spring'. *Cereal Res Commun* **31**: 331-338.
- ALONSO, J. M., A. N. STEPANOVA, T. J. LEISSE, C. J. KIM, H. CHEN *et al.*, 2003 Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- ANDERSON, E., and L. HUBRICHT, 1938 Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *Am J Bot* **25**: 396-492.
- ANDERSON, J. A., Y. OGIHARA, M. E. SORRELLS and S. D. TANKSLEY, 1992 Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor Appl Genet* **83**: 1035-1043.
- ANTTILA, C. K., C. C. DAEHLER, N. E. RANK and D. R. STRONG, 1998 Greater male fitness of a rare invader (*Spartina alterniflora*, Poaceae) threatens a common native (*Spartina foliosa*) with hybridization. *Am J Bot* **85**: 1597-1601.
- ARNOLD, M. L., C. M. BUCKNER and J. J. ROBINSON, 1991 Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1398-1402.
- AZPIROZLEECHAN, R., and K. A. FELDMANN, 1997 T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Going back and forth. *Trends Genet.* **13**: 152-156.
- BACKHOUSE, W. O., 1916 Note on inheritance of crossability. *J Genet* **6**: 91-94.
- BAHRMAN, N., M. ZIVY and H. THIELLEMENT, 1988 Genetic relationships in the Sitopsis section of *Triticum* and the origin of the B genome of polyploid wheats. *Heredity* **61**: 473-480.
- BAILEY, P. C., R. S. MCKIBBIN, J. R. LENTON, M. J. HOLDSWORTH, J. E. FLINTHAM *et al.*, 1999 Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. *Theor Appl Genet* **98**: 281-284.
- BATES, L. S., A. MUJEEBKAZI and R. F. WATERS, 1976 Wheat x barley hybrids - problems and potenials. *Cereal Res Commun* **4**: 377-386.
- BAUMANN, U., J. JUTTNER, X. BIAN and P. LANGRIDGE, 2000 Self-incompatibility in the Grasses. *Ann Bot* **85**: 203-209.
- BECHTOLD, N., J. ELLIS and G. PELLETIER, 1993 In-Planta Agrobacterium-Mediated Gene-Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie* **316**: 1194-1199.
- BENNETZEN, J. L., and W. RAMAKRISHNA, 2002 Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. *Plant Mol Biol* **48**: 821-827.
- BENT, A. F., 1996 Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771.

- BERTIN, I., L. FISH, T. N. FOOTE, E. KNIGHT, J. W. SNAPE *et al.*, 2009 Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the Kr1 locus. *Theor Appl Genet*.
- BICHENG, Y., T. DANNY, A. IAN and B. SUSANNE, 2008 How far are we from unravelling self-incompatibility in grasses? *New Phytol* **178**: 740-753.
- BOLOT, S., M. ABROUK, Q. U. MASOOD, N. STEIN, J. MESSING *et al.*, 2009 The 'inner circle' of the cereal genomes. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 119-125.
- BOSSOLINI, E., T. WICKER, P. A. KNOBEL and B. KELLER, 2007 Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant J* **49**: 704-717.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK and R. W. DAVIS, 1980 Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314-331.
- BOUCHEZ, D., and H. HOFTE, 1998 Functional Genomics in Plants. *Plant Physiol* **118**: 725-732.
- BRAATEN, D. C., J. R. THOMAS, R. D. LITTLE, K. R. DICKSON, I. GOLDBERG *et al.*, 1988 Locations and contexts of sequences that hybridize to Poly (dG-dT) (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucleic Acids Res* **16**: 865-881.
- BREWBAKER, J. L., 1957 POLLEN CYTOLOGY AND SELF-INCOMPATIBILITY SYSTEMS IN PLANTS. *J Hered* **48**: 271-277.
- BRIM, C., 1966 A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Sci* **6**: 220.
- CADALEN, T., C. BOEUF, S. BERNARD and M. BERNARD, 1997 An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. em Thell and comparison with a map from a wide cross. *Theor Appl Genet* **94**: 367-377.
- CALDWELL, K. S., P. LANGRIDGE and W. POWELL, 2004 Comparative sequence analysis of the region harboring the hardness locus in barley and its colinear region in rice. *Plant Physiol* **136**: 3177-3190.
- CAMERON, R. G., and B. J. REGER, 1991 Hybridization Barriers between Wheat and Rye - Invitro Pollen Assays and Electrophoretic Survey. *Euphytica* **52**: 147-153.
- CHANTRET, N., A. CENCI, F. SABOT, O. ANDERSON and J. DUBCOVSKY, 2004 Sequencing of the *Triticum monococcum* Hardness locus reveals good microcolinearity with rice. *Mol Genet Genomics* **271**: 377-386.
- CHANTRET, N., J. SALSE, F. SABOT, A. BELLEC, B. LAUBIN *et al.*, 2008 Contrasted microcolinearity and gene evolution within a homoeologous region of wheat and barley species. *J Mol Evol* **66**: 138-150.
- CHANTRET, N., J. SALSE, F. SABOT, S. RAHMAN, A. BELLEC *et al.*, 2005 Molecular basis of evolutionary events that shaped the Hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* **17**: 1033-1045.
- CHAO, S., P. J. SHARP, A. J. WORLAND, E. J. WARHAM, R. M. D. KOEBNER *et al.*, 1989 RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* **78**: 495-504.
- CHARPENTIER, A., M. FELDMAN and Y. CAUDERON, 1986 Chromosomal Pairing at Meiosis of F1-Hybrid and Backcross Derivatives of *Triticum aestivum* X Hexaploid *Agropyron auncum*. *Can J Genet Cytol* **28**: 1-6.
- CHEN, J., J. DING, Y. OUYANG, H. DU, J. YANG *et al.*, 2008 A triallelic system of *S₅* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica-japonica* hybrids in rice. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **105**: 11436-11441

- CHEN, M., P. SANMIGUEL, A. C. DEOLIVEIRA, S. S. WOO, H. ZHANG *et al.*, 1997 Microcolinearity in *sh2*-homologous regions of the maize, rice, and sorghum genomes. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **94**: 3431-3435.
- CHEN, M. S., P. SANMIGUEL and J. L. BENNETZEN, 1998 Sequence organization and conservation in *sh2/al*-homologous regions of sorghum and rice. *Genetics* **148**: 435-443.
- CHEN, Q., J. JAHIER and Y. CAUDERON, 1989 Production and Cytogenetical Studies of Hybrids between *Triticum aestivum* L. Thell and *Agropyron cristatum* (L) Gaertn. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie* **308**: 425-430.
- CHEN, Q., J. JAHIER and Y. CAUDERON, 1990 Intergeneric Hybrids between *Triticum aestivum* and 3 Crested Wheatgrasses - *Agropyron mongolicum*, *Agropyron michnoi*, and *Agropyron desertorum*. *Genome* **33**: 663-667.
- CHERN, C.-G., M.-J. FAN, S.-M. YU, A.-L. HOUR, P.-C. LU *et al.*, 2007 A rice phenomics study—phenotype scoring and seed propagation of a T-DNA insertion-induced rice mutant population. *Plant Mol Biol* **65**: 427-438.
- CHUECA, M. C., Y. CAUDERON and J. TEMPLE, 1977 In-vitro embryo culture technique to obtain. *Triticum aestivum* x *Aegilops* species hybrids. *Ann Amélior Plant* **27**: 539-547.
- CLAESSON, L., M. KOTIMAKI and R. VONBOTHMER, 1990 Production and Cytogenetic Analysis of the F1-Hybrid, *Elymus caninus*, *Triticum aestivum* and the Backcross to *Triticum aestivum*. *Cereal Res Commun* **18**: 315-319.
- COMEAU, A., G. FEDAK, C. A. STPIERRE and R. CAZEALT, 1988 Intergeneric Hybrids between *Hordeum jubatum* (4x) and *Triticum aestivum* (6x). *Genome* **30**: 245-249.
- COMEAU, A., G. FEDAK, C. A. STPIERRE and C. THERIAULT, 1985 Intergeneric Hybrids between *Triticum aestivum* and Species of *Agropyron* and *Elymus*. *Cereal Res Commun* **13**: 149-153.
- CONNOR, H. E., 1979 Breeding systems in the grasses: a survey. *N.Z. J. Bot.* **17**: 547-574.
- DEBORAH, C., V. XAVIER, C. VINCENT and G. SYLVAIN, 2005 Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective. *New Phytol* **168**: 61-69.
- DEVOS, K. M., 2005 Updating the 'Crop Circle'. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 155-162.
- DEVOS, K. M., M. D. ATKINSON, C. N. CHINOY, C. J. LIU and M. D. GALE, 1992 RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor Appl Genet* **83**: 931-939.
- DEVOS, K. M., and M. D. GALE, 1997 Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* **35**: 3-15.
- DEVOS, K. M., and M. D. GALE, 2000 Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell* **12**: 637-646.
- DEWEY, W. G., 1981 Wheat x *Agropyron* podperae. *Wheat Newsletter* **27**: 148.
- DIATCHENKO, L., Y. F. LAU, A. P. CAMPBELL, A. CHENCHIK, F. MOQADAM *et al.*, 1996 Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **93**: 6025-6030.
- DIATCHENKO, L., S. LUKYANOV, Y. F. LAU and P. D. SIEBERT, 1999 Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* **303**: 349-380.
- DINKA, S. J., M. A. CAMPBELL, T. DEMERS and M. N. RAIZADA, 2007 Predicting the Size of the Progeny Mapping Population Required to Positionally Clone a Gene. *Genetics* **176**: 2035-2054.
- DONINI, P., J. R. LAW, R. M. D. KOEBNER, J. C. REEVES and R. J. COOKE, 2000 Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theor Appl Genet* **100**: 912-917.

- DURRETT, R. T., K. Y. CHEN and S. D. TANKSLEY, 2002 A simple formula useful for positional cloning. *Genetics* **160**: 353-355.
- DVORAK, J., E. D. AKHUNOV, A. R. AKHUNOV, K. R. DEAL and M. C. LUO, 2006 Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Mol Biol Evol* **23**: 1386-1396.
- DVORAK, J., and K. C. CHEN, 1984 Distribution of Nonstructural Variation between Wheat Cultivars along Chromosome Arm 6Bp: Evidence from the Linkage Map and Physical Map of the Arm. *Genetics* **106**: 325-333.
- DVORAK, J., M. C. LUO, Z. L. YANG and H. B. ZHANG, 1998 The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* **97**: 657-670.
- DVORAK, J., P. TERLIZZI, H. B. ZHANG and P. RESTA, 1993 The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* **36**: 21-31.
- ELLSTRAND, N. C., and K. A. SCHIERENBECK, 2000 Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7043-7050.
- ENDO, T. R., 1988 Induction of Chromosomal Structural Changes by a Chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in Common Wheat. *J Hered* **79**: 366-370.
- ENDO, T. R., 2007 The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat. *Chromosome Res* **15**: 67-75.
- ENDO, T. R., and B. S. GILL, 1996 The deletion stocks of common wheat. *J Hered* **87**: 295-307.
- ESCOBAR-RESTREPO, J. M., N. HUCK, S. KESSLER, V. GAGLIARDINI, J. GHEYSELINCK *et al.*, 2007 The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* **317**: 656-660.
- EWING, B., and P. GREEN, 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-194.
- EWING, B., L. HILLIER, M. C. WENDL and P. GREEN, 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175-185.
- FALK, D. E., and K. J. KASHA, 1981 Comparison of the Crossability of Rye (*Secale cereale*) and *Hordeum Bulbosum* onto Wheat (*Triticum aestivum*). *Can J Genet Cytol* **23**: 81-88.
- FALK, D. E., and K. J. KASHA, 1983 Genetic-Studies of the Crossability of Hexaploid Wheat with Rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor Appl Genet* **64**: 303-307.
- FEDAK, G., 1985 Alien species sources of physiological traits for wheat improvement. *Euphytica* **34**: 673-680.
- FEDAK, G., 1999 Molecular aids for integration of alien chromatin through wide crosses. *Genome* **42**: 584-591.
- FEDAK, G., and P. Y. JUI, 1982 Chromosomes of Chinese Spring wheat carrying genes for crossability with Betzes barley. *Can J Genet Cytol* **24**: 227-233.
- FELIX, I., J. P. MARTINANT, M. BERNARD, S. BERNARD and G. BRANLARD, 1996 Genetic characterization of storage proteins in a set of F-1-derived haploid lines in bread wheat. *Theor Appl Genet* **92**: 340-346.
- FELTUS, F. A., J. WAN, S. R. SCHULZE, J. C. ESTILL, N. JIANG *et al.*, 2004 An SNP Resource for Rice Genetics and Breeding Based on Subspecies *Indica* and *Japonica* Genome Alignments. *Genome Res* **14**: 1812-1819.
- FEUILLET, C., and B. KELLER, 1999 High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **96**: 8265-8270.
- FEUILLET, C., and B. KELLER, 2002 Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann Bot (Lond)* **89**: 3-10.

- FEUILLET, C., P. LANGRIDGE and R. WAUGH, 2008 Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* **24**: 24-32.
- FINCH, R. A., and M. D. BENNETT, 1980 Mitotic and Meiotic Chromosome Behavior in New Hybrids of *Hordeum* with *Triticum* and *Secale*. *Heredity* **44**: 201-209.
- FITCH, W. M., 1970 Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* **19**: 99-106.
- FLAVELL, A. J., M. R. KNOX, S. R. PEARCE and T. H. N. ELLIS, 1998 Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J* **16**: 643-650.
- FRANKE, R., R. NESTROWICZ, A. SENULA and B. STAAT, 1992 Intergeneric Hybrids between *Triticum aestivum* L. and Wild Triticeae. *Hereditas* **116**: 225-231.
- FRANKLIN-TONG, V. E., and F. C. H. FRANKLIN, 2003 The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 1025-1032.
- FRANKLIN-TONG, V. E., G. HACKETT and P. K. HEPLER, 1997 Ratio-imaging of Ca-i(2+) in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *Plant J* **12**: 1375-1386.
- FRANKLIN-TONG, V. E., T. L. HOLDAWAY-CLARKE, K. R. STRAATMAN, J. G. KUNKE and P. K. HEPLER, 2002 Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J* **29**: 333-345.
- FRANKLIN-TONG, V. E., J. P. RIDE, N. D. READ, A. J. TREWAVAS and F. C. H. FRANKLIN, 1993 The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J* **4**: 163-177.
- FRANKLIN, F. C. H., M. J. LAWRENCE and V. E. FRANKLIN-TONG, 1985 Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int Rev Cytol* **158**:1-64.
- FRIEBE, B., J. H. HATCHETT, R. G. SEARS and B. S. GILL, 1990 Transfer of Hessian fly resistance from 'Chappon' rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. *Theor Appl Genet* **79**: 385-389.
- FRIEBE, B., J. JIANG, W. J. RAUPP, R. A. MCINTOSH and B. S. GILL, 1996 Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica* **91**: 59-87.
- FRITZ, A. K., T. S. COX, B. S. GILL and R. G. SEARS, 1995 Molecular Marker-Facilitated Analysis of Introgression in Winter-Wheat X *Triticum tauschii* Populations. *Crop Sci* **35**: 1691-1695.
- FU, H. H., and H. K. DOONER, 2002 Intrasppecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **99**: 9573-9578.
- FU, Y. B., G. W. PETERSON, K. W. RICHARDS, D. SOMERS, R. M. DEPAUW *et al.*, 2005 Allelic reduction and genetic shift in the Canadian hard red spring wheat germplasm released from 1845 to 2004. *Theor Appl Genet* **110**: 1505-1516.
- FU, Y. B., and D. J. SOMERS, 2009 Genome-Wide Reduction of Genetic Diversity in Wheat Breeding. *Crop Sci* **49**: 161-168.
- GALE, M. D., and K. M. DEVOS, 1998 Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **95**: 1971-1974.
- GALIBA, G., S. A. QUARRIE, J. SUTKA, A. MORGOUNOV and J. W. SNAPE, 1995 Rflp Mapping of the Vernalization (*Vrn1*) and Frost-Resistance (*Fr1*) Genes on Chromosome 5a of Wheat. *Theor Appl Genet* **90**: 1174-1179.
- GAUT, B. S., 2001 Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res* **11**: 55-66.
- GAUT, B. S., 2002 Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytol* **154**: 15-28.

- GAUTIER, M. F., M. E. ALEMAN, A. GUIRAO, D. MARION and P. JOUDRIER, 1994 *Triticum aestivum* Puroindolines, 2 Basic Cystine-Rich Seed Proteins - cDNA Sequence-Analysis and Developmental Gene-Expression. *Plant Mol Biol* **25**: 43-57.
- GAY, G., and M. BERNARD, 1994 Production of Intervarietal Substitution Lines with Improved Interspecific Crossability in the Wheat Cv Courtot. *Agronomie* **14**: 27-32.
- GE, X. C., C. DIETRICH, M. MATSUNO, G. J. LI, H. BERG *et al.*, 2005 An Arabidopsis aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *Embo Reports* **6**: 282-288.
- GERHOLD, D., T. RUSHMORE and C. T. CASKEY, 1999 DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem Sci* **24**: 168-173.
- GILES, R. J., and T. A. BROWN, 2006 GluDy allele variations in *Aegilops tauschii* and *Triticum aestivum*: implications for the origins of hexaploid wheats. *Theor Appl Genet* **112**: 1563-1572.
- GILL, B. S., and W. J. RAUPP, 1987 Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Sci* **27**: 445-450.
- GILL, K. S., B. S. GILL, T. R. ENDO and Y. MUKAI, 1993 Fine physical mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* **134**: 1231-1236.
- GILL, K. S., E. L. LUBBERS, B. S. GILL, W. J. RAUPP and T. S. COX, 1991 A Genetic-Linkage Map of *Triticum tauschii* (DD) and Its Relationship to the D-Genome of Bread Wheat (AABBDD). *Genome* **34**: 362-374.
- GOFF, S. A., D. RICKE, T. H. LAN, G. PRESTING, R. L. WANG *et al.*, 2002 A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Science* **296**: 92-100.
- GOLDMAN, I. L., T. R. ROCHEFORD and J. W. DUDLEY, 1993 Quantitative Trait Loci Influencing Protein and Starch Concentration in the Illinois Long-Term Selection Maize Strains. *Theor Appl Genet* **87**: 217-224.
- GORE, M. A., M. H. WRIGHT, E. S. ERSOZ, P. BOUFFARD, E. S. SZEKERES *et al.*, 2009 Large-Scale Discovery of Gene-Enriched SNPs. *Plant Genome* **2**: 121-133.
- GRIFFITHS, S., R. SHARP, T. N. FOOTE, I. BERTIN, M. WANOUS *et al.*, 2006 Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**: 749-752.
- GU, Y. Q., D. COLEMAN-DERR, X. Y. KONG and O. D. ANDERSON, 2004 Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four triticeae genomes. *Plant Physiol* **135**: 459-470.
- GUPTA, P. K., and G. FEDAK, 1985 Intergeneric Hybrids between *Hordeum californicum* and *Triticum aestivum*. *J Hered* **76**: 365-368.
- GUPTA, P. K., and R. K. VARSHNEY, 2000 The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* **113**: 163-185.
- HALDANE, J. B. S., 1919 The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* **8**: 299-309.
- HAMADA, H., M. G. PETRINO and T. KAKUNAGA, 1982 A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 6465-6469.
- HARLAN, J. R., and D. ZOHARY, 1966 Distribution of Wild Wheats and Barley. *Science* **153**: 1074-1080.
- HAUDRY, A., A. CENCI, C. RAVEL, T. BATAILLON, D. BRUNEL *et al.*, 2007 Grinding up wheat: A massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol Biol Evol* **24**: 1506-1517.

- HAYES, H. K., J. H. PARKER and C. KURTZWEL, 1920 Genetics of rust resistance in cross of varieties of *Triticum vulgare* with varieties of *T. durum* and *T. dicoccon*. J Agric Res (Washington, D.C) **19**: 523-542.
- HAYMAN, D. L., 1956 The genetical control of incompatibility in *Phalaris coerulescens*. Aust J Biol Sci **9**: 321-331.
- HEISER, C. B., 1973 Introgression re-examined. Bot Rev **39**: 347-366.
- HEUN, M., A. E. KENNEDY, J. A. ANDERSON, N. L. V. LAPITAN, M. E. SORRELLS *et al.*, 1991 Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). Genome **34**: 437-447.
- HEUN, M., R. SCHAFER-PREGL, D. KLANAN, R. CASTAGNA, M. ACCERBI *et al.*, 1997 Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. Science **278**: 1312-1314.
- HIROCHIKA, H., E. GUIDERDONI, G. AN, Y.-I. HSING, M. Y. EUN *et al.*, 2004 Rice Mutant Resources for Gene Discovery. Plant Mol Biol **54**: 325-334.
- HISCOCK, S. J., and D. A. TABAH, 2003 The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**: 1037-1045.
- HUANG, S. X., A. SIRIKHACHORNKIT, J. D. FARIS, X. J. SU, B. S. GILL *et al.*, 2002 Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. Plant Mol Biol **48**: 805-820.
- IGIC, B., and J. R. KOHN, 2001 Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. Proc Natl.Acad Sci U.S.A. **98**: 13167-13171.
- IGREJAS, G., P. LEROY, G. CHARMET, T. GABORIT, D. MARION *et al.*, 2002 Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet **106**: 19-27.
- IKEHASHI, H., and H. ARAKI, 1984 Variety screening of compatibility types revealed in F₁ fertility of distant cross in rice. Jpn J Breed **34**.
- IKEHASHI, H., and H. ARAKI, 1988 Multiple Alleles Controlling F₁-Sterility in Remote Crosses of Rice (*Oryza-Sativa*). Jap J Breed **38**: 283-291.
- ILIC, K., P. J. SANMIGUEL and J. L. BENNETZEN, 2003 A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. Proc Natl.Acad Sci U.S.A. **100**: 12265-12270.
- ISIDORE, E., B. SCHERRER, A. BELLEC, K. BUDIN, P. FAIVRE-RAMPANT *et al.*, 2005a Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. Funct Integr Genomics **5**: 97-103.
- ISIDORE, E., B. SCHERRER, B. CHALHOUB, C. FEUILLET and B. KELLER, 2005b Ancient haplotypes resulting from extensive molecular rearrangements in the wheat A genome have been maintained in species of three different ploidy levels. Genome Res **15**: 526-536.
- JALANI, B. S., and J. P. MOSS, 1980 The site of action of the crossability genes (*Kr1*, *Kr2*) between Triticum and Secale. I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. Euphytica **29**: 571-579.
- JALANI, B. S., and J. P. MOSS, 1981 The site of action of crossability genes (*Kr1*, *Kr2*) between Triticum and Secale II Proportion of pistils containing pollen tubes and effects of alternate pollination on seed set. Euphytica **30**: 105-112.
- JAMPATES, R., and J. DVORAK, 1986 Location of the Ph1 Locus in the Metaphase Chromosome Map and the Linkage Map of the 5bq Arm of Wheat. Can J Genet Cytol **28**: 511-519.
- JANDA, J., J. BARTOŠ, J. SAFAR, M. KUBALÁKOVÁ, M. VALÁRIK *et al.*, 2004 Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. Theor Appl Genet **109**: 1337-1345.

- JIANG, J. M., B. FRIEBE and B. S. GILL, 1994 Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica* **73**: 199-212.
- JIANG, J. M., and D. J. LIU, 1987 New Hordeum-Triticum Hybrids. *Cereal Res Commun* **15**: 95-99.
- JIN, Y.-F., and T.-F. BIAN, 2004 Isolation and Partial Characterization of a Novel Pollen-specific cDNA with Multiple Polyadenylation Sites from Wheat. *Acta Biochim Biophys Sin* **36**: 467-476.
- JOVKOVA, M. E., E. KONDEVA and R. KOSTOVA, 1977 Biochemical investigations on *Aegilops crassa* x *Triticum aestivum* hybrids. *Genet Sel* **10**.
- KAKITA, M., K. MURASE, M. IWANO, T. MATSUMOTO, M. WATANABE *et al.*, 2007 Two Distinct Forms of M-Locus Protein Kinase Localize to the Plasma Membrane and Interact Directly with S-Locus Receptor Kinase to Transduce Self-Incompatibility Signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell* **19**: 3961-3973.
- KALENDAR, R., T. GROB, M. REGINA, A. SUONIEMI and A. SCHULMAN, 1999 IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* **98**: 704-711.
- KAMMORGAN, L. N. W., B. S. GILL and S. MUTHUKRISHNAN, 1989 DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms - a Strategy for Genetic-Mapping of D Genome of Wheat. *Genome* **32**: 724-732.
- KAPLAN, N. L., R. R. HUDSON and C. H. LANGLEY, 1989 The "Hitchhiking Effect" Revisited. *Genetics* **123**: 887-899.
- KARAKOUSIS, A., J. P. GUSTAFSON, K. J. CHALMERS, A. R. BARR and P. LANGRIDGE, 2003 A consensus map of barley integrating SSR, RFLP, and AFLP markers. *Aust J Agric Res* **54**: 1173-1185.
- KELLER, B., and C. FEUILLET, 2000 Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Sci* **5**: 246-251.
- KELLER, B., C. FEUILLET and N. YAHIAOUI, 2005 Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a supersize genome. *Genet Res* **85**: 93-100.
- KENWARD, K. D., D. BAI, M. R. BAN and J. E. BRANDLE, 1999 Isolation and characterization of Tnd-1, a retrotransposon marker linked to black root rot resistance in tobacco. *Theor Appl Genet* **98**: 387-395.
- KHUSH, G. S., 2001 Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* **2**: 815-822.
- KIHARA, H., 1944 Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agric Hortic* **19**: 13-14.
- KILIAN, A., J. CHEN, F. HAN, B. STEFFENSON and A. KLEINHOF, 1997 Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol* **35**: 187-195.
- KILIAN, A., D. A. KUDRNA, A. KLEINHOF, M. YANO, N. KURATA *et al.*, 1995 Rice-Barley Synteny and Its Application to Saturation Mapping of the Barley *Rpg1* Region. *Nucleic Acids Res* **23**: 2729-2733.
- KILIAN, B., H. OZKAN, O. DEUSCH, S. EFFGEN, A. BRANDOLINI *et al.*, 2007 Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Mol Biol Evol* **24**: 217-227.
- KIMBER, G., and M. ABUBAKAR, 1979 Wheat hybrid information system. *Cereal Res Commun* **7**: 257-259.
- KIMBER, G., and M. FELDMAN, 1987 Wild Wheat an Introduction. University of Missouri Press. Columbia, Mo. Special report, 353.

- KNOBLOCH, I. W., 1968 *A check list of crosses in the Gramineae*. East Lansing, Department of Botany and Plant Physiology, Michigan State University.
- KOIDE, Y., K. ONISHI, D. NISHIMOTO, A. R. BARUAH, A. KANAZAWA *et al.*, 2008 Sex-independent transmission ratio distortion system responsible for reproductive barriers between Asian and African rice species. *New Phytol* **179**: 888-900.
- KOSAMBI, D. D., 1944 The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* **12**: 172-175.
- KOTA, R., R. VARSHNEY, M. PRASAD, H. ZHANG, N. STEIN *et al.*, 2008 EST-derived single nucleotide polymorphism markers for assembling genetic and physical maps of the barley genome. *Funct Integr Genomics* **8**: 223-233.
- KRATTINGER, S., T. WICKER and B. KELLER, 2009 Map-Based Cloning of Genes in Triticeae (Wheat and Barley), pp. 337-357 in *Genetics and Genomics of the Triticeae*.
- KROLOW, K. D., 1970 Investigations on compatibility between wheat and rye. *Z PXanzenzüchtg* **64**: 44-72.
- KRUSE, A., 1976 Reciprocal hybrids between the genera *Hordeum*, *Secale* and *Triticum*. *Hereditas* **84**: 244.
- KUBO, T., Y. YAMAGATA, M. EGUCHI and A. YOSHIMURA, 2008 A novel epistatic interaction at two loci causing hybrid male sterility in an inter-subspecific cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet Syst* **83**: 443-453.
- KUMAR, A., S. R. PEARCE, K. MCLEAN, G. HARRISON, J. S. HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997 The Ty1-copia group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* **100**: 205-217.
- KUMAR, S., B. S. GILL and J. FARIS, 2007 Identification and characterization of segregation distortion loci along chromosome 5B in tetraploid wheat. *Mol Genet Genomics* **278**: 187-196.
- LAI, Z., K. LIVINGSTONE, Y. ZOU, S. CHURCH, S. KNAPP *et al.*, 2005 Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor Appl Genet* **111**: 1532-1544.
- LAMOUREUX, D., 2002 Approche méthodologique du clonage positionnel de gènes chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), pp. 202 in *UMR Amélioration et Santé des Plantes – INRA Clermont-Ferrand*. Université Blaise Pascal, Clermont ferrand.
- LAMOUREUX, D., C. BOEUF, F. REGAD, O. GARSMEUR, G. CHARMET *et al.*, 2002 Comparative mapping of the wheat 5B short chromosome arm distal region with rice, relative to a crossability locus. *Theor Appl Genet* **105**: 759-765.
- LAN, L., W. CHEN, Y. LAI, J. SUO, Z. KONG *et al.*, 2004 Monitoring of Gene Expression Profiles and Isolation of Candidate Genes Involved in Pollination and Fertilization in Rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA Microarray. *Plant Mol Biol* **54**: 471-487.
- LANDER, E. S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. J. DALY *et al.*, 1987 MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181.
- LANGE, W., and R. RILEY, 1973 The position on chromosome 5B of wheat of the locus determining crossability with rye. *Genet Res* **22** 143-153.
- LANGE, W., and B. WOJCIECHOWSKA, 1976 The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.) I Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* **25**: 609-620.
- LAURIE, D. A., and M. D. BENNETT, 1987 The effect of the crossability loci *Kr1* and *Kr2* on fertilization frequency in hexaploid wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* **73**: 403-409.
- LEIGHTY, C. E., and W. J. SANDO, 1928 Natural and artificial hybrids of a Chinese wheat and rye. *J Hered* **19**: 23-27.

- LEIN, A., 1943 The genetical basis of the crossability between wheat and rye. . Z. Indukt Abstamm VererbLehre. **81**: 28–59.
- LEVIN, D. A., 1967 Hybridization between annual species of Phlox: Population structure. Am J Bot **54**: 1122–1130.
- LEVINSON, G., and G. A. GUTMAN, 1987 Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol **4**: 203–321.
- LI, D., L. CHEN, L. JIANG, S. ZHU, Z. ZHAO *et al.*, 2007 Fine mapping of *S32(t)*, a new gene causing hybrid embryo sac sterility in a Chinese landrace rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet **114**: 515–524.
- LI, L. H., and Y. S. DONG, 1991 Hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron-Michnoi* Roshev .1. Production and Cytogenetic Study of F1 Hybrids. Theor Appl Genet **81**: 312–316.
- LI, W. L., and B. S. GILL, 2002 The Colinearity of the *Sh2/Al* Orthologous Region in Rice, Sorghum and Maize is Interrupted and Accompanied by Genome Expansion in the Triticeae. Genetics **160**: 1153–1162.
- LI, W. L., P. ZHANG, J. P. FELLERS, B. FRIEBE and B. S. GILL, 2004 Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. Plant J **40**: 500–511.
- LI, X. M., N. PAECH, J. NIELD, D. HAYMAN and P. LANGRIDGE, 1997 Self-incompatibility in the grasses: Evolutionary relationship of the *S* gene from *Phalaris coerulescens* to homologous sequences in other grasses. Plant Mol Biol **34**: 223–232.
- LIMIN, A. E., and D. B. FOWLER, 1990 An Interspecific Hybrid and Amphiploid Produced from *Triticum aestivum* Crosses with *Agropyron cristatum* and *Agropyron desertorum*. Genome **33**: 581–584.
- LIN, Y. R., K. F. SCHERTZ and A. H. PATERSON, 1995 Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. Genetics **141**: 391–411.
- LINKIEWICZ, A. M., L. L. QI, B. S. GILL, A. RATNASIRI, B. ECHALIER *et al.*, 2004 A 2500-Locus Bin Map of Wheat Homoeologous Group 5 Provides Insights on Gene Distribution and Colinearity With Rice. Genetics **168**: 665–676.
- LITT, M., and J. A. LUTY, 1989 A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet **44**: 397–401.
- LIU, K. D., J. WANG, H. B. LI, C. G. XU, A. M. LIU *et al.*, 1997 A genome-wide analysis of wide compatibility in rice and the precise location of the *S-5* locus in the molecular map. Theor Appl Genet **95**: 809–814.
- LIU, Y. G., N. MORI and K. TSUNEWAKI, 1990 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. Jpn J Genet **65**: 367–380.
- LIU, Y. S., L. H. ZHU, J. S. SUN and Y. CHEN, 2000 Mapping QTLs for defective female gametophyte development in an inter-subspecific cross in *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet **102**: 1243–1251.
- LIU, Z. W., R. R. C. WANG and J. G. CARMAN, 1994 Hybrids and Backcross Progenies between Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Apomictic Australian Wheatgrass [*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm) a-Love and Conner] - Karyotypic and Genomic Analyses. Theor Appl Genet **89**: 599–605.
- LU, B. R., and R. VONBOTHMER, 1989 Cytological Studies of a Dihaploid and Hybrid from Intergeneric Cross *Elymus shandongensis* X *Triticum aestivum*. Hereditas **111**: 231–238.

- LU, B. R., and R. VONBOTHMER, 1991 Production and Cytogenetic Analysis of the Intergeneric Hybrids between 9 *Elymus* Species and Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* **58**: 81-95.
- LUNDQVIST, A., 1954 Studies on self-sterility in rye. *Hereditas* **40**: 278-294.
- MAGO, R., S. NAIR and M. MOHAN, 1999 Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* **99**: 50-57.
- MARAIS, G. F., M. HORN and F. TORR, 1994 Intergeneric Transfer (Rye to Wheat) of a Gene(s) for Russian Wheat Aphid Resistance. *Plant Breed.* **113**: 265-271.
- MARTIENSSEN, R. A., 1998 Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **95**: 2021-2026.
- MARTIN, A., and V. CHAPMAN, 1977 A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum aestivum*. *Cereal Res Commun* **5**: 365-368.
- MCCLURE, B., and V. FRANKLIN-TONG, 2006 Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta* **224**: 233-245.
- MCCLURE, B. A., V. HARING, P. R. EBERT, M. A. ANDERSON, R. J. SIMPSON *et al.*, 1989 Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957.
- McFADDEN, E. S., and E. R. SEARS, 1946 The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered* **37**: 81-89 et 107-116.
- MCGUIRE, P. E., Y. Z. GAN, C. O. QUALSET and J. DVORAK, 1995 Resistance to barley yellow-dwarf-virus disease in derivatives of crosses between hexaploid wheat and species of *Lophopyrum* (Triticeae; Poaceae). *Plant Breed.* **114**: 287-290.
- MEISTER, N., and N. A. TJUMJAKOFF, 1928 Rye–wheat hybrids from reciprocal crosses. *J Genet* **20**: 233–245.
- MILLER, T. E., S. M. READER and G. M.D., 1983 The effect of homoeologous group 3 chromosomes on pairing and crossability in *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol* **25**: 634-641.
- MOHLER, V., A. KLAHR, G. WENZEL and G. SCHWARZ, 2002 A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, wheat and rye. *Theor Appl Genet* **105**: 364-368.
- MOLNÁR-LÁNG, M., and J. SUTKA, 1994 The effect of temperature on seed set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. *Euphytica* **78**: 53-58.
- MONNA, L., N. KITAZAWA, R. YOSHINO, J. SUZUKI, H. MASUDA *et al.*, 2002 Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* **9**: 11-17.
- MOORE, G., 1995b Cereal genome evolution: pastoral pursuits with 'Lego' genomes. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 717-724.
- MOORE, G., K. M. DEVOS, Z. WANG and M. D. GALE, 1995a Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* **5**: 737-739.
- MUJEEB-KAZI, A., and M. BERNARD, 1982 Somatic chromosome variations in backcross 1 progenies from intergeneric hybrids involving some triticeae. *Cereal Res Commun* **10**: 41-44.
- MUJEEBKAZI, A., and M. BERNARD, 1985 Cytogenetics of Intergeneric *Elymus canadensis* X *Triticum aestivum* Hybrids (N=5x=35, Shabd) and Their Backcross Progenies with *T. aestivum*. *Plant Breed.* **95**: 50-62.
- MUJEEBKAZI, A., and R. RODRIGUEZ, 1981 An Intergeneric Hybrid of *Triticum aestivum* L. x *Elymus giganteus*. *J Hered* **72**: 253-256.

- MUJEEBKAZI, A., S. ROLDAN and J. L. MIRANDA, 1984 Intergeneric Hybrids of *Triticum aestivum* L. with Agropyron and Elymus Species. *Cereal Res Commun* **12**: 75-79.
- MUJEEBKAZI, A., S. ROLDAN, D. Y. SUH, L. A. SITCH and S. FAROOQ, 1987 Production and Cytogenetic Analysis of Hybrids between *Triticum aestivum* and Some Caespitose Agropyron Species. *Genome* **29**: 537-553.
- MUJEEBKAZI, A., S. ROLDAN, D. Y. SUH, N. TERKUILE and S. FAROOQ, 1989 Production and Cytogenetics of *Triticum aestivum* L. Hybrids with Some Rhizomatous Agropyron Species. *Theor Appl Genet* **77**: 162-168.
- MURASE, K., H. SHIBA, M. IWANO, F.-S. CHE, M. WATANABE *et al.*, 2004 A Membrane-Anchored Protein Kinase Involved in Brassica Self-Incompatibility Signaling. *Science* **303**: 1516-1519.
- NASRALLAH, J. B., and M. E. NASRALLAH, 1993 Pollen[mdash]Stigma Signaling in the Sporophytic Self-Incompatibility Response. *Plant Cell* **5**: 1325-1335.
- OCKENDON, D. J., 1974 Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussels sprouts. *Heredity* **33**: 159-171.
- OETTLER, G., 2005 The fortune of a botanical curiosity; Triticale: past, present and future. *The Journal of Agricultural Science* **143**: 329-346.
- OLSEN, K. M., A. L. CAICEDO, N. POLATO, A. MCCLUNG, S. MCCOUCH *et al.*, 2006 Selection under domestication: evidence for a sweep in the rice waxy genomic region. *Genetics* **173**: 975-983.
- OZKAN, H., A. BRANDOLINI, C. POZZI, S. EFFGEN, J. WUNDER *et al.*, 2005 A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats. *Theor Appl Genet* **110**: 1052-1060.
- PANDEY, K. K., 1977 Origin of Complementary Incompatibility Systems in Flowering Plants. *Theor Appl Genet* **49**: 101-109.
- PARINOV, S., and V. SUNDARESAN, 2000 Functional genomics in Arabidopsis: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 157-161.
- PATERSON, A. H., Y. R. LIN, Z. LI, K. F. SCHERTZ, J. F. DOEBLEY *et al.*, 1995 Convergent Domestication of Cereal Crops by Independent Mutations at Corresponding Genetic Loci. *Science* **269**: 1714-1718.
- PAUX, E., D. ROGER, E. BADAIEVA, G. GAY, M. BERNARD *et al.*, 2006 Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant J* **48**: 463-474.
- PAUX, E., and P. SOURDILLE, 2009 A Toolbox for Triticeae Genomics, pp. 255-283 in *Genetics and Genomics of the Triticeae*.
- PAUX, E., P. SOURDILLE, J. SALSE, C. SAINTENAC, F. CHOLET *et al.*, 2008 A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* **322**: 101-104.
- PENG, J., D. E. RICHARDS, N. M. HARTLEY, G. P. MURPHY, K. M. DEVOS *et al.*, 1999 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261.
- PEREIRA, A., 2000 A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res* **9**: 245-260.
- PERSHINA, L. A., O. M. NUMEROVA, L. I. BELOVA, E. P. DEVIATKINA and V. K. SHUMNY, 1988 Fertility in Barley X Wheat Hybrids *Hordeum geniculatum* All X *Triticum aestivum* L., Their Regenerants and Hybrid Progeny of Backcrosses to *Triticum aestivum* L. *Cereal Res Commun* **16**: 157-163.

- PFLIEGER, S., V. LEFEBVRE, C. CARANTA, A. BLATTES, B. GOFFINET *et al.*, 1999 Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* **42**: 1100-1110.
- PIENAAR, R. D. V., 1981 Genome Relationships in Wheat X *Agropyron distichum* (Thunb) Beauv Hybrids). *Plant Breed.* **87**: 193-212.
- PLOURDE, A., A. COMEAU, G. FEDAK and C. A. STPIERRE, 1989a Production and Cytogenetics of Hybrids of *Triticum aestivum* X *Leymus innovatus*. *Theor Appl Genet* **78**: 436-444.
- PLOURDE, A., A. COMEAU, G. FEDAK and C. A. STPIERRE, 1989b Intergeneric Hybrids of *Triticum aestivum* X *Leymus multicaulis*. *Genome* **32**: 282-287.
- PLOURDE, A., A. COMEAU and C. A. STPIERRE, 1992 Barley Yellow Dwarf Virus-Resistance in *Triticum aestivum* X *Leymus angustus* Hybrids. *Plant Breed.* **108**: 97-103.
- PLOURDE, A., G. FEDAK, C. A. STPIERRE and A. COMEAU, 1990 A Novel Intergeneric Hybrid in the Triticeae - *Triticum aestivum* X *Psathyrostachys juncea*. *Theor Appl Genet* **79**: 45-48.
- QI, L. L., B. ECHALIER, S. CHAO, G. R. LAZO, G. E. BUTLER *et al.*, 2004 A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* **168**: 701-712.
- QI, L. L., B. FRIEBE, P. ZHANG and B. S. GILL, 2007 Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res* **15**: 3-19.
- QIU, S. Q., K. LIU, J. X. JIANG, X. SONG, C. G. XU *et al.*, 2005 Delimitation of the rice wide compatibility gene *S5ⁿ* to a 40-kb DNA fragment. *Theor Appl Genet* **111**: 1080-1086.
- RABINOVICH, S. V., 1998 Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. *Euphytica* **100**: 323-340.
- READER, S. M., and T. E. MILLER, 1991 The introduction into bread wheat of a major gene for resistance to powdery mildew from wild emmer wheat. *Euphytica* **53**: 57-60.
- REIF, J. C., P. ZHANG, S. DREISIGACKER, M. L. WARBURTON, M. V. GINKEL *et al.*, 2005 Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor Appl Genet* **110**: 859-864.
- RENWICK, J. H., 1971 The Mapping of Human Chromosomes. *Annu Rev Genet* **5**: 81-120.
- RIESEBERG, L. H., 1991 Homoploid reticulate evolution in *Helianthus*: Evidence from ribosomal genes. *Am J Bot* **78**: 1218-1237.
- RIESEBERG, L. H., O. RAYMOND, D. M. ROSENTHAL, Z. LAI, K. LIVINGSTONE *et al.*, 2003 Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301**: 1211-1216.
- RIESEBERG, L. H., and J. F. WENDEL (Editors), 1993 *Introgression and its consequences in plants. in R.G. Harrison(ed.) Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, Oxford. UK.
- RIESEBERG, L. H., and J. F. WENDEL, 1997 Hybrid origins of plant species. *Annu Rev Ecol Syst* **28**: 359-389.
- RILEY, R., and V. CHAPMAN, 1958 Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *Nature* **182**: 713-715.
- RILEY, R., and V. CHAPMAN, 1967 The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet Res* **9**: 259-267.
- RILEY, R., V. CHAPMAN and G. KIMBER, 1959 Genetic Control of Chromosome Pairing in Intergeneric Hybrids with Wheat. *Nature* **183**: 1244-1246.
- ROMERO, C., and C. CUADRADO, 1992 Parental Genotype Influence on Seed-Set in Different Wheat X Rye Crosses. *Cereal Res Commun* **20**: 193-199.
- ROMMENS, J. M., M. C. IANNUZZI, B. S. KEREM, M. L. DRUMM, G. MELMER *et al.*, 1989 Identification of the Cystic-Fibrosis Gene - Chromosome Walking and Jumping. *Science* **245**: 1059-1065.

- ROUSSEL, V., J. KOENIG, M. BECKERT and F. BALFOURIER, 2004 Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* **108**: 920-930.
- ROUSSEL, V., L. LEISOVA, F. EXBRAYAT, Z. STEHNO and F. BALFOURIER, 2005 SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theor Appl Genet* **111**: 162-170.
- SAINTENAC, C., M. FALQUE, O. C. MARTIN, E. PAUX, C. FEUILLET *et al.*, 2009 Detailed Recombination Studies Along Chromosome 3B Provide New Insights on Crossover Distribution in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* **181**: 393-403.
- SALSE, J., and C. FEUILLET, 2007 Comparative Genomics of Cereals, pp. 177-205 in *Genomics-Assisted Crop Improvement*.
- SANMIGUEL, P. J., W. RAMAKRISHNA, J. L. BENNETZEN, C. S. BUSO and J. DUBCOVSKY, 2002 Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A^m. *Funct Integr Genomics* **2**: 70-80.
- SCHAFER, R., S. ALI and J. T. EPPLER, 1986 The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma* **93**: 502-510.
- SCHERRER, B., E. ISIDORE, P. KLEIN, J. S. KIM, A. BELLEC *et al.*, 2005 Large intraspecific haplotype variability at the *Rph7* locus results from rapid and recent divergence in the barley genome. *Plant Cell* **17**: 361-374.
- SCHOPFER, C. R., and J. B. NASRALLAH, 2000 Self-Incompatibility. Prospects for a Novel Putative Peptide-Signaling Molecule. *Plant Physiol* **124**: 935-940.
- SCHOPFER, C. R., M. E. NASRALLAH and J. B. NASRALLAH, 1999 The Male Determinant of Self-Incompatibility in Brassica. *Science* **286**: 1697-1700.
- SCHULMAN, A. H., A. J. FLAVELL and T. H. ELLIS, 2004 The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol* **260**: 145-173.
- SEARS, E. R., 1954 The aneuploids of common wheat. *Mo Agric Exp Stn Res Bull* **572**: 19.
- SEARS, E. R., 1966 Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In: Riley R, Lewis KR (eds), pp. 29-45 in *Proc 10th Int Bot Congress*, Oliver & Boyd, Edinburgh, Scotland.
- SEARS, E. R., and M. OKAMOTO, 1958 Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proc. Tenth Int. Congr. Genet.* **2**: 258-259.
- SEQUENCINGPROJECTINTERNATIONALRICEGENOME, 2005 The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800.
- SHARMA, H. C., and P. S. BAENZIGER, 1986 Production, Morphology, and Cytogenetic Analysis of *Elymus caninus* (*Agropyron caninum*) X *Triticum aestivum* F1-Hybrids and Backcross-1 Derivatives. *Theor Appl Genet* **71**: 750-756.
- SHARMA, H. C., and B. S. GILL, 1981a New hybrids between agropyron and wheat. *Wheat info Serv* **52**: 19-22.
- SHARMA, H. C., and B. S. GILL, 1981b Wheat Hybridization. *Wheat Newsletter* **27**: 106.
- SHARMA, H. C., and B. S. GILL, 1983a Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* **32**: 17-31.
- SHARMA, H. C., and B. S. GILL, 1983b New Hybrids between Agropyron and Wheat .2. Production, Morphology and Cytogenetic Analysis of F1 Hybrids and Backcross Derivatives. *Theor Appl Genet* **66**: 111-121.
- SIJACIC, P., X. WANG, A. L. SKIRPAN, Y. WANG, P. E. DOWD *et al.*, 2004 Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305.
- SIRKKA, A., T. IMMONEN, G. VARUGHESE, W. H. PFEIFFER and A. MUJEEB-KAZI, 1992 Crossability of tetraploid and hexaploid wheats with ryes for primary triticales production. *Euphytica* **65**: 203-210.

- SITCH, L. A., and J. W. SNAPE, 1987 Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotypic and environmental effects on pollen grain germination, pollen tube growth and the frequency of fertilization. *Euphytica* **36**: 483-496.
- SITCH, L. A., J. W. SNAPE and S. J. FIRMAN, 1985 Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet* **70**: 309-314.
- SMITH, D. C., 1942 Ingergeneric hybridization of cereals and other grasses. *J Agric Res* **64**: 33-47.
- SMITH, J. M., and J. HAIGH, 1974 The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* **23**: 23-35.
- SNAPE, J. W., V. CHAPMAN, J. P. MOSS, C. E. BLANCHARD and T. E. MILLER, 1979 The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity* **42**: 291-298.
- SOLTIS, D. E., and P. S. SOLTIS, 1999 Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol Evol* **14**: 348-352.
- SOMERS, D. J., P. ISAAC and K. EDWARDS, 2004 A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **109**: 1105-1114.
- SOMERS, D. J., R. KIRKPATRICK, M. MONIWA and A. WALSH, 2003 Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* **46**: 431-437.
- SONG, R. T., and J. MESSING, 2003 Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **100**: 9055-9060.
- SONG, X., S. Q. QIU, C. G. XU, X. H. LI and Q. F. ZHANG, 2005 Genetic dissection of embryo sac fertility, pollen fertility, and their contributions to spikelet fertility of intersubspecific hybrids in rice. *Theor Appl Genet* **110**: 205-211.
- SORRELLS, M. E., M. LA ROTA, C. E. BERMUDEZ-KANDIANIS, R. A. GREENE, R. KANTETY *et al.*, 2003 Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res* **13**: 1818-1827.
- SOURDILLE, P., G. CHARMET, M. TROTTET, M. H. TIXIER, C. BOEUF *et al.*, 1998 Linkage between RFLP molecular markers and the dwarfing genes *Rht-B1* and *Rht-D1* in wheat. *Hereditas* **128**: 41-46.
- SOURDILLE, P., M. R. PERRETANT, G. CHARMET, P. LEROY, M. F. GAUTIER *et al.*, 1996 Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theor Appl Genet* **93**: 580-586.
- SOURDILLE, P., S. SINGH, T. CADALEN, G. BROWN-GUEDIRA, G. GAY *et al.*, 2004 Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & Integrative Genomics* **4**: 12-25.
- STEIN, J. C., B. HOWLETT, D. C. BOYES, M. E. NASRALLAH and J. B. NASRALLAH, 1991 Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **88**: 8816-8820.
- STEIN, N., C. FEUILLET, T. WICKER, E. SCHLAGENHAUF and B. KELLER, 2000 Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **97**: 13436-13441.
- STEIN, N., M. PRASAD, U. SCHOLZ, T. THIEL, H. ZHANG *et al.*, 2007 A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* **114**: 823-839.
- SWANSON, R., A. F. EDLUND and D. PREUSS, 2004 SPECIES SPECIFICITY IN POLLEN-PISTIL INTERACTIONS. *Annu Rev Genet* **38**: 793-818.
- TAIRA, T., and E. N. LARTER, 1977 Effects of Variation in Ambient-Temperature Alone and in Combination with Epsilon-Amino-Normal-Caproic Acid on Development of

- Embryos from Wheat-Rye Crosses (*T. turgidum* Var. *durum* Cv. Jori X *S. cereale*). Can J Bot **55**: 2335-2337.
- TAKASAKI, T., K. HATAKEYAMA, G. SUZUKI, M. WATANABE, A. ISOGAI *et al.*, 2000 The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. Nature **403**: 913-916.
- TAKAYAMA, S., and A. ISOGAI, 2005 Self-incompatibility in plants. Annu Rev Plant Biol **56**: 467-489.
- TAKAYAMA, S., H. SHIBA, M. IWANO, H. SHIMOSATO, F.-S. CHE *et al.*, 2000 The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. Proc Natl.Acad Sci U.S.A. **97**: 1920-1925.
- TAKAYAMA, S., H. SHIMOSATO, H. SHIBA, M. FUNATO, F.-S. CHE *et al.*, 2001 Direct ligand-receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. Nature **413**: 534-538.
- TAKUMI, S., and T. SHIMADA, 1997 Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues. Genes Genet Syst **72**: 63-69.
- TANKSLEY, S. D., M. W. GANAL and G. B. MARTIN, 1995 Chromosome Landing - a Paradigm for Map-Based Gene Cloning in Plants with Large Genomes. Trends Genet. **11**: 63-68.
- TANKSLEY, S. D., and S. R. MCCOUCH, 1997 Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science **277**: 1063-1066.
- TANNO, K.-I., and G. WILLCOX, 2006 How Fast Was Wild Wheat Domesticated? Science **311**: 1886-.
- TARCHINI, R., P. BIDDLE, R. WINELAND, S. TINGEY and A. RAFALSKI, 2000 The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. Plant Cell **12**: 381-391.
- TATIANA, K., S. ILDIKO, B. DORIS, C. S. K., J. SHUYE *et al.*, 2004 Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. Plant J **37**: 301-314.
- TAUTZ, D., and M. RENZ, 1984 Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res **12**: 4127-4138.
- TAYLOR, J. W., and K. S. QUISENBERRY, 1935 Inheritance of rye crossability in wheat hybrids. J Am Soc Agric. **27**: 149-153.
- THORSTENSON, Y. R., S. P. HUNICKE-SMITH, P. J. OEFNER and R. W. DAVIS, 1998 An Automated Hydrodynamic Process for Controlled, Unbiased DNA Shearing. Genome Res **8** 848-855.
- THUILLET, A. C., T. BATAILLON, P. SOURDILLE and J. L. DAVID, 2004 Factors affecting polymorphism at microsatellite loci in bread wheat *Triticum aestivum* (L.) Thell: effects of mutation processes and physical distance from the centromere. Theor Appl Genet **108**: 368-377.
- TIEHAN, Z., P. MARGARET, L. PETER, P. MANOJ, G. ANDREAS *et al.*, 2006 Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. Plant J **47**: 811-826.
- TIKHONOV, A. P., P. J. SANMIGUEL, Y. NAKAJIMA, N. M. GORENSTEIN, J. L. BENNETZEN *et al.*, 1999 Colinearity and its exceptions in orthologous adh regions of maize and sorghum. Proc Natl.Acad Sci U.S.A. **96**: 7409-7414.
- TIXIER, M. H., P. SOURDILLE, G. CHARMET, G. GAY, C. JABY *et al.*, 1998 Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled haploid population. Theor Appl Genet **97**: 1076-1082.
- TOZU, T., 1966 Crossability between wheat and rye. Seiken Zihō **18**:: 33-38.

- TUINSTR, M. R., G. EJETA and P. B. GOLDSBROUGH, 1997 Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theor Appl Genet* **95**: 1005-1011.
- TURNER, M., Y. MUKAI, P. LEROY, B. CHAREF, R. APPELS *et al.*, 1999 The *Ha* locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses. *Genome* **42**: 1242-1250.
- VAN DEYNZE, A. E., M. E. SORRELLS, W. D. PARK, N. M. AYRES, H. FU *et al.*, 1998 Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor Appl Genet* **97**: 356-369.
- VARSHNEY, R. K., A. GRANER and M. E. SORRELLS, 2005 Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* **23**: 48-55.
- VERGNAUD, G., 1989 Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucleic Acids Res* **17**: 7623-7630.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. V. D. LEE *et al.*, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- WANG, K., L. GAN, E. JEFFERY, M. GAYLE, A. M. GOWN *et al.*, 1999 Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* **229**: 101-108.
- WAUGH, R., K. MCLEAN, A. J. FLAVELL, S. R. PEARCE, A. KUMAR *et al.*, 1997 Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol Gen Genet* **253**: 687-694.
- WENDEL, J. F., P. D. OLSON and J. M. STEWART, 1989 Genetic diversity, introgression, and independent domestication of old world cultivated cottons. *Am J Bot* **76**: 1795-1806.
- WICKER, T., N. YAHIAOUI, R. GUYOT, E. SCHLAGENHAUF, Z. D. LIU *et al.*, 2003 Rapid genome divergence at orthologous low molecular weight glutenin loci of the A and A(m) genomes of wheat. *Plant Cell* **15**: 1186-1197.
- WILLIAMS, C. E., C. C. COLLIER, N. SARDESAI, H. W. OHM and S. E. CAMBRON, 2003 Phenotypic assessment and mapped markers for *H31*, a new wheat gene conferring resistance to Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae). *Theor Appl Genet* **107**: 1516-1523.
- WOLFE, K. H., M. GOUY, Y. W. YANG, P. M. SHARP and W. H. LI, 1989 Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **86**: 6201-6205
- WRIGHT, S. I., I. V. BI, S. G. SCHROEDER, M. YAMASAKI, J. F. DOEBLEY *et al.*, 2005 The effects of artificial selection of the maize genome. *Science* **308**: 1310-1314.
- YAN, L., A. LOUKOIANOV, G. TRANQUILLI, M. HELGUERA, T. FAHIMA *et al.*, 2003 Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **100**: 6263-6268.
- YANAGIHARA, S., S. R. MCCOUCH, K. ISHIKAWA, Y. OGI, K. MARUYAMA *et al.*, 1995 Molecular Analysis of the Inheritance of the *S-5* Locus, Conferring Wide Compatibility in Indica-Japonica Hybrids of Rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **90**: 182-188.
- YEN, Y., and D. LIU, 1987 Production, Morphology, and Cytogenetics of Intergeneric Hybrids of Elymus L. Species with *Triticum aestivum* L. and Their Backcross Derivatives. *Genome* **29**: 689-694.
- YU, J., S. N. HU, J. WANG, G. K. S. WONG, S. G. LI *et al.*, 2002 A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* **296**: 79-92.
- YUAN, W.-Y., M. TOMITA, S.-C. SUN and Y. YASUMURO, 1998 Introduction of multi-alien chromatins carrying different powdery mildew-resistant genes from rye and *Haynaldia villosa* into wheat genome. *Genes & Genetic Systems* **73**: 377-384.

- ZARCO-HERNANDEZ, J. A., F. SANTIVERI, A. MICHELENA and R. J. PENA, 2005 Durum wheat (*Triticum turgidum* L.) carrying the 1BL/1RS chromosomal translocation: agronomic performance and quality characteristics under Mediterranean conditions. *Eur J Agron* **22**: 33-43.
- ZEVEN, A. C., 1987 Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica* **36**: 299-319.
- ZEVEN, A. C., and C. VAN HEEMERT, 1970 Germination of pollen of weed rye (*Secale segetale* L.) on wheat (*Triticum aestivum* L.) stigmas and the growth of the pollen tubes. *Euphytica* **19**: 175-179.
- ZHANG, L. Y., M. BERNARD, P. LEROY, C. FEUILLET and P. SOURDILLE, 2005 High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theor Appl Genet* **111**: 677-687.
- ZHAO, Z. G., L. JIANG, W. W. ZHANG, C. Y. YU, S. S. ZHU *et al.*, 2007 Fine mapping of *S31*, a gene responsible for hybrid embryo-sac abortion in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **226**: 1087-1096.
- ZHENG-SONG, P., L. DENG-CAI, Y. CHI and Y. JUN-LIANG, 1998 Crossability of tetraploid wheat landraces native to Sichuan, Shaanxi, Gansu and Xinjiang provinces, China with rye. *Genet. Resour. Crop Evol.* **45**: 57-62.
- ZHENG, Y. L., M. C. LUO, C. YEN and J. L. YANG, 1992 Chromosome location of a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf Serv* **75**: 36-40.
- ZOHARY, D., and M. HOPF, 1993 *Domestication of Plants in the Old World The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley* Clarendon Press, Oxford, UK.

Annexes

Annexe 1

Phénotypage et génotypage avec les marqueurs dl103 et gpw1072 des 69 SSD sélectionnés dans la population MP98 x Ct.
AC : Aptitude au croisement exprimée en %, ET : Ecart type, IC : intervalle de confiance. (A) : Allèle du parent Courtot, (B)
Allèle du parent MP98 (fond génétique de CS).

Individus	Nombre de grain obtenu (blé x seigle)				Nombre total		Phénotype					Génotype	
	épi N°1	épi N°2	épi N°3	épi N°4	Fleurs	grains	AC maximum (%)	AC moyenne (%)	ET (%)	IC (%)	Allele*	dl103	gpw1072
Ct	0	0	0	-	60	0,0	0	0	0	0	A	A	A
CS	18	19	19	19	80	75,0	95	93,75	2,5	2,83	B	B	B
MP98	13	14	15	-	60	42,0	75	70	5	5,66	B	B	B
I : 50 SDD sélectionnés en se basant seulement sur les marqueurs dl103 et gpw1072													
SSD026	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD715	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD046	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD095	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD098	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD182	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD530	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD566	0	0	0	0	80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD580	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD617	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD628	0	0	0	0	80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD661	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD708	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD713	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD717	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD604	0	0	0	1	80	1,0	5,0	1,3	2,5	2,4	A	A	B
SSD015	0	0	1	-	60	1,0	5,0	1,7	2,9	3,3	A	A	B
SSD021	0	1	-	-	40	1,0	5,0	2,5	3,5	4,9	A	A	B
SSD284	0	1	-	-	40	1,0	5,0	2,5	3,5	4,9	A	A	B
SSD117	0	0	1	2	80	3,0	10,0	3,8	4,8	4,7	A	A	B
SSD132	0	1	2	0	80	3,0	10,0	3,8	4,8	4,7	A	A	B
SSD512	1	1	-	-	40	2,0	5,0	5,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD655	1	1	-	-	40	2,0	5,0	5,0	0,0	0,0	A	A	B
SSD422	0	0	2	2	80	4,0	10,0	5,0	5,8	5,7	A	A	B
SSD673	1	2	-	-	40	3,0	10,0	7,5	3,5	4,9	A	B	A
SSD290	8	9	-	-	40	17,0	45,0	42,5	3,5	4,9	B	B	A
SSD178	9	10	-	-	40	19,0	50,0	47,5	3,5	4,9	B	B	A
SSD382	9	10	10	-	60	29,0	50,0	48,3	2,9	3,3	B	B	A
SSD502	10	10	-	-	40	20,0	50,0	50,0	0,0	0,0	B	B	A
SSD478	10	12	-	-	40	22,0	60,0	55,0	7,1	9,8	B	B	A
SSD727	11	12	-	-	40	23,0	57,9	56,4	2,0	2,2	B	B	A
SSD609	12	12	-	-	40	24,0	60,0	60,0	0,0	0,0	B	B	A
SSD405	10	14	-	-	40	24,0	70,0	60,0	14,1	19,6	B	B	A
SSD088	11	14	-	-	40	25,0	70,0	62,5	10,6	14,7	B	A	B
SSD540	10	15	-	-	40	25,0	75,0	62,5	17,7	24,5	B	B	A
SSD022	11	11	16	-	60	38,0	80,0	63,3	14,4	16,3	B	B	A

Annexe 1, Suite

Individus	Nombre de grain obtenu (blé x seigle)				Nombre total		Phénotype					Génotype	
	épi N°1	épi N°2	épi N°3	épi N°4	Fleurs	grains	AC maximum ,,.,,	AC moyenne ,,.,,	ET (%)	IC (%)	Allele*	dl103	gpw1072
SSD445	13	13	-	-	40	26,0	65,0	65,0	0,0	0,0	B	B	A
SSD536	13	13	-	-	40	26,0	75,0	65,0	0,0	0,0	B	B	A
SSD355	11	15	-	-	40	26,0	75,0	65,0	14,1	19,6	B	B	A
SSD376	12	13	17	-	60	42,0	85,0	70,0	13,2	15,0	B	B	A
SSD452	13	16	-	-	40	29,0	80,0	72,5	10,6	14,7	B	B	A
SSD211	14	15	15	-	60	44,0	75,0	73,3	2,9	3,3	B	B	A
SSD167	14	16	-	-	40	30,0	80,0	75,0	7,1	9,8	B	B	A
SSD141	14	17	-	-	40	31,0	85,0	77,5	10,6	14,7	B	B	A
SSD489	13	16	17	18	80	64,0	90,0	80,0	10,8	10,6	B	B	A
SSD596	15	15	16	18	80	64,0	90,0	80,0	7,1	6,9	B	B	A
SSD620	15	15	18	-	60	48,0	90,0	80,0	8,7	9,8	B	B	A
SSD524	16	18	-	-	40	34,0	90,0	85,0	7,1	9,8	B	B	A
SSD585	17	18	-	-	40	35,0	90,0	87,5	3,5	4,9	B	A	B
SSD674	18	19	-	-	40	37,0	95,0	92,5	3,5	4,9	B	B	A

II : 19 SSD supposés être double recombinant (hypothèse que les marqueurs dl103 et gpw1072 encadrent le locus SKr)

SSD058	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD127	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD214	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD267	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD343	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD399	0	0	-	-	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD410	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD481	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD575	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD664	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD699	0	0	0	-	60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	A	B	B
SSD229	0	0	0	1	80	1,0	5,0	1,3	2,5	2,4	A	B	B
SSD073	1	0	0	-	60	1,0	5,0	1,7	2,9	3,3	A	B	B
SSD194	0	1	0	-	60	1,0	5,0	1,7	2,9	3,3	A	B	B
SSD384	0	0	1	-	60	1,0	5,0	1,7	2,9	3,3	A	B	B
SSD277	0	0	0	2	80	2,0	10,0	2,5	5,0	4,9	A	B	B
SSD294	8	10	-	-	40	18,0	50,0	45,0	7,1	9,8	B	A	A
SSD226	12	13	17	-	60	42,0	85,0	70,0	13,2	15,0	B	A	A
SSD280	12	15	16	-	60	43,0	80,0	71,7	10,4	11,8	B	A	A

* la détermination de l'allèle parental pour un individu donné est basée sur la classe de l'aptitude au croisement.

Annexe 2

13 marqueurs SSR (nom initié par cfb) et 17 marqueurs ISBP (nom initié par cfp) désignés pendant nos travaux de thèse sur la séquence du clone BAC 1793L02 (Acc. CT009585, (CHANTRET *et al.* 2005).

Nom	Forward (5'...'3)	Reverse (5'...'3)
cfb301	CCTCCGTCTGAAAAACAAGCG	CATGAAGATCCTACCGCGAG
cfb302	ACTTCATGCGCGACTTTTTG	CCGCTTCACCTACACCTAC
cfb303	CAAGGAAGTTTATAGGCGGG	GTTACAGGAGTTGAGTGTTCC
cfb304	GGAAGGATCTCATGGGTTGAG	GCTTGTGTTTCTTTGCACCCC
cfb305	GAGTGAGGGTGTCAAAATGTG	CCTGGGAAAGTTCTTGACGC
cfb306	TAAAGCGGATGGGTCTTGTT	ATAAGATTACCTCGGGTGAA
cfb307	TCTCCACTCGTCTTTCATT	GCGAAAGCGAGAGTTTTGTG
cfb308	CATTTGTTGTGGTCTCCTTT	TGTCTCAAGAAGGGAAGAAA
cfb309	TAGGGCATATTTCCAACACT	TAAGTCCGCGTATTAGCATT
cfb310	TTGACATATCCCAATGTGTG	GTGATGTGACGACGGCTGAC
cfb311	ATCCGGAGTCTGTATACGTG	CACCTCAATCTTCAAAGAGG
cfb312	CCTCTTTGAAGATTGAGGTG	CCCATTTCTCTCCTTAGGTT
cfb313	GCAGATAGGGCAGGAAAGATT	ATGCACATGCATCTCACGTAT
cfp1001	CACTAAGTTACCTCAACGGGG	ACGCGACCTACTGTGACAAAC
cfp1002	ATCGGAAGGGGAAACCCTTC	CACGCGTGGATTCAATGAAGG
cfp1003	GATGTGATGGTTGCTTGTCGG	CCATTACACATGATATGACCCC
cfp1004	CTTGAGCCTACTAGACTAGG	CCATGGTCGACTGATTCCCC
cfp1005	GCATCCATTACAAC TTCACGG	GGATTGTTCAACTGCGAAAGG
cfp184	CTGGCACAGGTGTCATCAT	TCTTGTGGGCCTTTACTTGG
cfp185	CGGGAAAACCTTAAGCATCA	CGGTTGTGATGGACACTTGG
cfp186	CATACTCCCTCCGTTCCAAA	TGCATTCTTAATGCGCTCTG
cfp187	CATTGCCCTAGTGAGGGAAG	CATTTGGATCCGAACATTCA
cfp188	AGTTACGAAAACAGCCCCCT	CCGCTTAGCGATCTACAAGG
cfp189	TTTGCCACATCAGCATGTTT	CCGAGGGAGAAGAAGAGTT
cfp190	GGGCTATTCCGGATGAATTT	GAGATCCGGGGGTATCAACT
cfp191	ACAAGGGCAAAAGTGTTTGG	CCACCCGAAGGAGTTGAATA
cfp192	CCTTACCTTCATGGGCTTCA	GCAAAGGGAAGAAGGGAAC
cfp193	GTTTGACTTTCGGCAAAACC	AAAAAGGAACTGCATTGCG
cfp194	AACTCTGCACGCATCTCTCA	GCGGAGAATGTCAAGAGAGG
cfp195	TCTAAAAGCGTTTGGGTTGC	TGCTGGACAAGCTACTCCCT

Annexe 3

26 marqueurs SSR (nom initié par cfb) et 10 marqueurs ISBP (nom initié par cfp) désignés sur la séquence du clone BAC 317L24 (CS).

Nom	Forward (5'...3')	Reverse (5'...3')
cfb314	TCAAATAGACCCAGTGCCAGT	GAGAGAGATGGCACATGGAAG
cfb315	CTCTTTCACGGTGACACACAA	CCCCAAATCCATGTCAATGTA
cfb316	CCCCTCTTTGTCTGCTGCTA	GGGAGAGAGGACGAGAGAAAC
cfb317	CAAGAATATCCGCTGAGCTA	CTCATACCGCGGTGACATTAG
cfb318	TGAGTGATTTCGGCTAAGCAAC	AAGTCCGCGTATTAGCATTGA
cfb319	AGTGAACCGGACCTGATACC	CGTCAACGACCTGAAACATCT
cfb320	TCACCCTGCTGGTTATCAACT	TACTGAAACTGAGGCAGCACA
cfb321	TCTTCCATTCTTTGTCCAGA	GAGGAGGATCCCAGATTGTCT
cfb322	GACAAATCTGGGATCCTCCTC	CATGCGTTTGTCTAGCAACAC
cfb323	TAGTTTCGCGCCACCTAAGTA	AAGCCACCATAACCCGATTAT
cfb324	TCTCCACTTTTCCCCACTCTT	AAGACCGACCGGATCCAC
cfb325	AGCACAAATGGAAAAGAAGCA	GCACAAATGACCAAGTTTAGC
cfb326	CTGTGATGCCCCGACCTC	AAAAGGGGGAAGAACTCACCT
cfb327	CTTCCACCGAATTCATCGAC	GAGCTGGGCTAGTTACCTGCT
cfb328	TGATTCTATAAACCCACGTCCT	TCGGCTATTTGGTCACATTTT
cfb329	TTTGGATTCCCAAACCTCTC	GATAAATGGCATGCTTTCTGC
cfb330	AGGTGAAAAGATCTCGGTTCC	GTGGTGAGGTGCGTACCAG
cfb331	TAATTAGGGCCTGCTTCTGCT	CAGATGCTTCCTTCATCCAAA
cfb332	GAACCGGAGGGAGTACAAAAG	TGGTGTGAACAGAAAAGGAAA
cfb333	TCTTCCATTCTTTGTCCAGA	GAGGAGGATCCCAGATTTGTC
cfb334	CTTTTGGGGTGAAACAGACAC	GAGTGGGGAAAAGTGGAGAAG
cfb335	GAACAAGCATATCCAACACACA	AACTTGCAATGGTTGGAACCTG
cfb336	CTGCAGGCTACGCGTTACTTA	CCAGCAACGCTTACTGTTTCT
cfb337	CATACGCCTCACATCCTTGTT	ATATTCCGTGGCACACATCAT
cfb338	CTCCCAAATCCACTTCTCCTC	GGGGGTGCTAGACTTGATCTC
cfb339	TCCTATTTTGTCTGTCTCTTTTA	GGGGAAGGAAAATAAAGAAA
cfp4000	CGTGTTGAGTGATTTCGGCTA	AGTCCGCGTATTAGCATTGA
cfp4001	TCTTAGCTATGCAGAGGCCG	TAAATTCCACGGCACATCAA
cfp4002	ACGATGTGTGAGCAAATGA	CTGCGTTTTTCATGTTTCGTGT
cfp4003	GGAGATGTGTAGTGCGGGTT	tttttGAACCctAAccTGTaAA
cfp4004	ATCGTGAGTCCCTGACCTTG	AGCTAGCTGACGGCAAACAT
cfp4005	TCATTGCCTGGATATCGTCA	AGAAGTAGGAGCCCACCACA
cfp4006	TTCTTCATGCGTTTGACAGC	AAGCAATTTCCACTACATACGGA
cfp4007	CACACATACGCCTCACATCC	AGATTCAATTCATTCTGCCCA
cfp4008	TTCTTCGATTGTCTGCATGG	CCTCCGTTCCACAATACAGG
cfp4009	CATGGAAGACCCACCAAATC	TGGATGTCAATATTTTTGCTCTG

Annexe 4

SSRs (cfb) et ISBS (cfp) désalignés de la séquence shotgun du clone BAC 2163O14

Nom	Foeward (5'...3')	Reverse (5'...3')
cfb342	AGGCAAATACGACAAAAGCAA	ATGTCGTGCTGTGGACATACA
cfb343	ACGAGCATTTTCGTAGCATTGT	TCATCATGGTGAAGCTGTGAA
cfb344	CGAGGTGTTGGCTCTAACTGA	GTTAGCAGCAGTAGCGAAGGA
cfb345	GTTGAGTCCGAGGAACTCTC	CCAGCTACAGGAGCACATCTT
cfb346	AGCATGGGAGAAAGAGGAGAG	TATGGTTAAGGGCATCCACAA
cfb347	GCACGTGTAGGTTGAGCACTT	TGCAACACTCACACAAACACA
cfb348	CACGTAGGCAGGTCCATGTAT	CTTTCTCGCACGCATTCTCTA
cfb349	GACATGCCTTTTGTGTTTTGG	GAGGCTGAAGCTGCATTCTTT
cfb350	GTACGACACCTCCGAGTTCAG	CGGTCATATCATCGCAGAGTT
cfb351	TCCTGATTGGTGGAGTCAGTT	GGAGAGGGATGGGGTTTG
cfb352	CTCGAAGTCGTCAGCAGACTC	GACTTGCAACCGGAGAAGTG
cfb353	CTTTCTCGCACGCATTCTCTA	CACGTAGGCAGGTCCATGTAT
cfb354	ACGAGCATTTTCGTAGCATTGT	TCATCATGGTGAAGCTGTGAA
cfb355	CTTTCTTATGGGATGCCTGCT	GATTGGCCTGCTGTCAGTAAC
cfb356	GAGGCTGAAGCTGCATTCTTT	GACATGCCTTTTGTGTTTTGG
cfb357	GAGGTCGAGTTCATACCAGCTT	ATGCTTGCAGATTCCAGCTTA
cfb358	GAACCTCATCCATGCAACACT	GAGTGTGTGTTTGTCTGTGG
cfb359	CAAGTGATGTTCTCACAGCAA	TACACATGGCGAAGATGTTGA
cfb360	GTTGAGTCCGAGGAACTCTC	CCAGCTACAGGAGCACATCTT
cfb361	GATTGACAACCCCTTTATTGT	ATGCAGCAATAGTAGCGTAAA
cfb362	ACTACTCTACATGCGTCTGA	GAAAATACTTTTGGCCTCAT
cfb363	GACAGGGCGACGGGATAG	CTTGTCGCCACCCCATC
cfb364	TGAAGGCTTGAGATGGACAAA	CAGGCAATGCTTATGAAGAAGA
cfb365	ATAGGGGTTGTCCCGCTCT	CGCTTACCTACACCTACGTC
cfb383	ACGTGCTTGAGGAACACGTC	GCTGGAAACGCTTCGCCTACT
cfp4010	TGACCGAGGTGGAATATGGT	TGCAGCATGACAAGAGGTTT
cfp4011	GAAAAATGATTTGGTCTAATTTTGC	GTGCACATGTGTGTATCTTGG
cfp4012	CGGCCCTAAGACATCAATCA	GCGCGCTGATAAGTTACCTC
cfp4013	AGGAGGCGAGGGACACAATA	CACAAAAAGGTCGCAAATGA
cfp4014	AAACGCAAAACGAAAAAGGA	GGGAAAGGGGAAGAACAGAG
cfp4015	CAAAATACCGAGGGGTTGCTA	GGTTGAAGCAGTAGCGGAGA
cfp4016	AACCGGAGAGTTTGGTCCTT	TTGAGCCCTTCTAAGCGAAA
cfp4017	AAGCATCGATACGACTGAGAA	CTTTGGTTGACTTGCCCAAT
cfp4018	CCAGCTTCAATTACCAACTCC	GGCCTCCGGTTAGTAGGTTG
cfp4019	TTTGTTGGCTTGAGAGTCAT	GGGCTTTAGTCCCCACTCTT
cfp4020	GAACACTGGGGGACAGAAAA	TGAACAAAGGTGATCGGACA
cfp4021	CGGATGGAGATGATAAAATGG	CCTCCCCCTAGTCCGAAT
cfp4022	AAGTGGGAGGGGAACCAG	CGGCCTGGAGATGGAATC
cfp4023	GCAATGTAGGCCTCTGCAAT	TGATGGTGCATTTGGATGTT
cfp4024	GAAGTGTGCCGATAATGCTG	CCAGGAAACCATCCTGGTAA
cfp4025	CCGAACCTGGGTAAACATTG	ATGATTGAATCTCGGGCAAG
cfp4026	CAAAGCCATCCACATCTCTACGA	ATTCATCCAGCCCTCCACACC
cfp4027	TGCGCAAAGTTCAGATAATTCAA	GGATGAGCGATTCCACGTGTC
cfp4028	CCCTCCCGGATAGGATTGAAC	TGTTGCCTGGTCTGGGAGAGA

Annexe 5

Test d'aptitude de 223 individus de la population d'autofécondation SSD254.14 avec le seigle (*Secale cereale* var. Dankowskie Nowe)

(AC) : aptitude au croisement, (ET) : Ecart type, (IC) : Intervalle de confiance, (NC) : non croisable, (C) : croisable. Individus ordonnés selon leur ordre croissant d'aptitude au croisement exprimé en %.

Individus	Nombre de grains			AC (%) par épi			AC (%) moyenne	ET	EC	Phénotype
	epi1	epi2	epi3	epi1	epi2	epi3				
F6.S004	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S005	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S009	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S010	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S015	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S016	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S017	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S019	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S020	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S025	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S027	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S028	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S029	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S030	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S035	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S036	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S039	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S041	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S043	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S046	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S051	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S052	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S054	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S056	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S057	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S061	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S072	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S077	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S088	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S089	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S105	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S108	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S109	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S110	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S114	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S115	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S116	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S117	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S126	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S129	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S142	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S143	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S147	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S151	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S153	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S154	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S155	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S156	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S158	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC

Annexe 5, suite -1

Individus	Epi 1	Epi 2	Epi 3	Epi 1	Epi 2	Epi 3	AC (%) moyenne	ET %	IC %	Phénotype
F6.S161	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S173	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S174	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S179	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S186	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S190	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S192	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S193	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S201	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S204	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S205	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S206	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S207	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S209	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S214	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S217	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S220	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	NC
F6.S001	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S006	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S008	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S011	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S022	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S031	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S048	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S053	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S058	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S059	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S063	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S066	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S070	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S073	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S074	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S078	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S082	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S083	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S084	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S085	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S092	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S093	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S097	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S098	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S101	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S103	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S119	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S121	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S122	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S130	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S132	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S144	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S148	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S157	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S172	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S175	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S178	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S181	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S191	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S197	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S199	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S208	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S219	0	0	1	0	0	5	3	3,5	1,7	NC
F6.S012	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC

Annexe 5, suite -2

Individus	Epi 1	Epi 2	Epi 3	Epi 1	Epi 2	Epi 3	AC (%) moyenne	ET %	IC %	Phénotype
F6.S024	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S034	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S037	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S049	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S081	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S102	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S107	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S111	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S112	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S118	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S128	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S138	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S145	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S159	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S165	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S176	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S180	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S183	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S211	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S221	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S223	0	1	1	0	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S222	1	1	1	5	5	5	5	0,0	0,0	NC
F6.S021	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S038	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S064	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S071	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S080	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S087	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S094	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S095	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S096	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S104	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S125	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S140	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S149	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S194	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S200	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S202	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S213	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S215	0	0	2	0	0	10	5	7,1	3,4	NC
F6.S042	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S079	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S090	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S120	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S135	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S164	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S171	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S182	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S195	0	1	2	0	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S045	1	1	2	5	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S137	1	1	2	5	5	10	8	3,5	1,7	NC
F6.S047	0	0	3	0	0	15	8	10,6	5,1	NC
F6.S069	0	0	3	0	0	15	8	10,6	5,1	NC
F6.S160	0	0	3	0	0	15	8	10,6	5,1	NC
F6.S169	0	0	3	0	0	15	8	10,6	5,1	NC
F6.S076	2	2	2	10	10	10	10	0,0	0,0	NC
F6.S113	0	1	3	0	5	15	10	7,1	3,4	NC
F6.S100	0	0	4	0	0	20	10	14,1	6,7	NC
F6.S203	1	2	3	5	10	15	13	3,5	1,7	NC
F6.S013	0	1	4	0	5	20	13	10,6	5,1	NC
F6.S044	0	1	4	0	5	20	13	10,6	5,1	NC

Annexe 5, suite-3

Individus	Epi 1	Epi 2	Epi 3	Epi 1	Epi 2	Epi 3	AC (%) moyenne	ET %	IC %	Phénotype
F6.S075	0	1	4	0	5	20	13	10,6	5,1	NC
F6.S136	0	1	4	0	5	20	13	10,6	5,1	NC
F6.S099	1	1	4	5	5	20	13	10,6	5,1	NC
F6.S166	0	0	5	0	0	25	13	17,7	8,4	NC
F6.S168	0	0	5	0	0	25	13	17,7	8,4	NC
F6.S146	0	1	5	0	5	25	15	14,1	6,7	NC
F6.S167	0	1	5	0	5	25	15	14,1	6,7	NC
F6.S198	0	3	4	0	15	20	18	3,5	1,7	NC
F6.S018	1	1	6	5	5	30	18	17,7	8,4	NC
F6.S184	-	8	10	0	40	50	45	7,1	3,4	C
F6.S062	5	9	9	25	45	45	45	0,0	0,0	C
F6.S002	8	9	9	40	45	45	45	0,0	0,0	C
F6.S218	6	8	11	30	40	55	48	10,6	5,1	C
F6.S150	8	10	10	40	50	50	50	0,0	0,0	C
F6.S040	4	9	11	20	45	55	50	7,1	3,4	C
F6.S216	5	10	11	25	50	55	53	3,5	1,7	C
F6.S163	7	10	11	35	50	55	53	3,5	1,7	C
F6.S189	9	10	11	45	50	55	53	3,5	1,7	C
F6.S196	9	10	11	45	50	55	53	3,5	1,7	C
F6.S023	7	9	12	35	45	60	53	10,6	5,1	C
F6.S141	8	9	12	40	45	60	53	10,6	5,1	C
F6.S007	8	8	13	40	40	65	53	17,7	8,4	C
F6.S133	5	9	13	25	45	65	55	14,1	6,7	C
F6.S188	6	10	12	30	50	60	55	7,1	3,4	C
F6.S123	10	10	12	50	50	60	55	7,1	3,4	C
F6.S067	9	11	11	44	55	55	55	0,0	0,0	C
F6.S032	9	9	14	45	45	70	58	17,7	8,4	C
F6.S086	4	10	14	20	50	70	60	14,1	6,7	C
F6.S124	8	11	13	40	55	65	60	7,1	3,4	C
F6.S055	-	13	12	0	65	60	63	3,5	1,7	C
F6.S050	11	12	13	55	60	65	63	3,5	1,7	C
F6.S065	12	12	13	60	60	65	63	3,5	1,7	C
F6.S212	6	11	15	30	55	75	65	14,1	6,7	C
F6.S106	-	13	13	0	65	65	65	0,0	0,0	C
F6.S139	9	13	13	44	65	65	65	0,0	0,0	C
F6.S170	10	12	14	50	60	70	65	7,1	3,4	C
F6.S060	9	10	16	45	50	80	65	21,2	10,1	C
F6.S127	7	9	17	35	45	85	65	28,3	13,5	C
F6.S026	10	13	14	50	65	70	68	3,5	1,7	C
F6.S091	10	12	15	50	60	75	68	10,6	5,1	C
F6.S068	-	11	16	-	55	80	68	17,7	8,4	C
F6.S152	12	13	15	60	65	75	70	7,1	3,4	C
F6.S134	6	12	16	30	60	80	70	14,1	6,7	C
F6.S177	10	12	16	50	60	80	70	14,1	6,7	C
F6.S131	14	14	15	70	70	75	73	3,5	1,7	C
F6.S185	8	13	16	40	65	80	73	10,6	5,1	C
F6.S014	3	12	17	15	60	85	73	17,7	8,4	C
F6.S210	11	14	17	55	70	85	78	10,6	5,1	C
F6.S033	15	16	17	75	80	85	83	3,5	1,7	C
F6.S187	9	14	20	45	70	100	85	21,2	10,1	C
F6.S003	10	16	19	50	80	95	88	10,6	5,1	C
F6.S162	3	18	18	15	90	90	90	0,0	0,0	C

Publication (*Alfares et al, Genetics 2009*)

Fine Mapping and Marker Development for the Crossability Gene *SKr* on Chromosome 5BS of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Walid Alfares,* Annaig Bouguennec,* François Balfourier,* Georges Gay,* Hélène Bergès,[†] Sonia Vautrin,[†] Pierre Sourdil,* Michel Bernard* and Catherine Feuillet*¹

*Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Université Blaise Pascal, Unité Mixte de Recherche 1095, Genetics Diversity and Ecophysiology of Cereals, 63100 Clermont-Ferrand, France and [†]INRA-Centre National de Ressources Génétiques Végétales, 31326 Castanet Tolosan, France

Manuscript received July 24, 2009
Accepted for publication July 30, 2009

ABSTRACT

Most elite wheat varieties cannot be crossed with related species thereby restricting greatly the germplasm that can be used for alien introgression in breeding programs. Inhibition to crossability is controlled genetically and a number of QTL have been identified to date, including the major gene *Kr1* on 5BL and *SKr*; a strong QTL affecting crossability between wheat and rye on chromosome 5BS. In this study, we used a recombinant SSD population originating from a cross between the poorly crossable cultivar Courtot (Ct) and the crossable line MP98 to characterize the major dominant effect of *SKr* and map the gene at the distal end of the chromosome near the 5B homeologous *GSP* locus. Colinearity with barley and rice was used to saturate the *SKr* region with new markers and establish orthologous relationships with a 54-kb region on rice chromosome 12. In total, five markers were mapped within a genetic interval of 0.3 cM and 400 kb of BAC contigs were established on both sides of the gene to lay the foundation for map-based cloning of *SKr*. Two SSR markers completely linked to *SKr* were used to evaluate a collection of crossable wheat progenies originating from primary triticale breeding programs. The results confirm the major effect of *SKr* on crossability and the usefulness of the two markers for the efficient introgression of crossability in elite wheat varieties.

DURING domestication and selection of a number of important crop species, diversity has eroded resulting in increased vulnerability to biotic and abiotic stresses while also jeopardizing the potential for sustained genetic improvement of elite cultivars over the long term (TANKSLEY and MCCOUCH 1997; FU and SOMERS 2009). The reintroduction of the remarkable diversity present in the different gene pools into elite varieties through intra- and interspecific crosses (primary and secondary gene pools) and intergeneric crosses (tertiary gene pools) has been practiced for decades in cereals (FEUILLET *et al.* 2008). Despite some highly significant successes, including the incorporation of dwarfing and disease-resistance genes that fueled the Green Revolution, introgression remains laborious and, for complex characters, largely unfulfilled. Wheat (*Triticum aestivum* L.) has been crossed

with a wide range of related species from the Triticeae tribe (JIANG *et al.* 1994), such as Aegilops, Agropyron, Haynaldia, Secale, and Hordeum, which represent a reservoir of interesting alleles for improving wheat resistance to biotic (diseases, insects) and abiotic stresses (cold, salinity, and drought) as well as for quality traits such as grain protein content (FEDAK 1985). Intergeneric crosses have resulted in the transfer of desirable rye (*Secale cereale* L.) characteristics into wheat (FLORELL 1931) with one of the best examples being the 1BL/1RS chromosomal translocation that provided novel race-specific resistance to rust diseases, improved adaptation and stress tolerance, superior aerial biomass, and higher kernel weight to wheat varieties (ZARCO-HERNANDEZ *et al.* 2005). However, most of the adapted wheat germplasm is not crossable with alien species thereby restricting the panel of lines that can be used for alien introgression in wheat breeding (KROLOW 1970) or for the production of primary triticale, a man-made wheat-rye hybrid.

Beginning in the early 1900s, researchers were producing experimental crosses between bread wheat, *T. aestivum* L. ($2n = 6x = 42$) as a recipient, and rye, *S. cereale* L. ($2n = 14$) as the pollen donor (BACKHOUSE 1916). Genetic studies conducted by LEIN (1943) showed that dominant alleles of two genes, named *Kr1* and *Kr2*,

Supporting information is available online at <http://www.genetics.org/cgi/content/full/genetics.109.107706/DC1>.

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under accession nos. FJ666341, FJ666342, FJ666343, FJ666344, FJ666345, FJ666346, FJ805254, FJ805255, GQ219777, and GQ219778.

¹Corresponding author: INRA/UBP UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysologie des Céréales Domaine de Crouelle, 234 avenue du Brézat, 63100 Clermont Ferrand, France.
E-mail: catherine.feUILLET@clermont.inra.fr

are responsible for the poor crossability between bread wheat and rye. *Kr1* and *Kr2* genes were localized roughly on chromosome 5B and 5A, respectively (RILEY and CHAPMAN 1967) and subsequently located more precisely on the long arms of these two chromosomes (LANGE and RILEY 1973; SITCH *et al.* 1985). Further studies indicated that the dominant alleles driving incompatibility of crossing wheat with rye act by actively inhibiting the production of intergeneric hybrids (RILEY and CHAPMAN 1967; LANGE and WOJCIECHOWSKA 1976; JALANI and MOSS 1980, 1981; CAMERON and REGER 1991). Other crossability genes, such as *Kr3* on chromosome 5D (KROLOW 1970) and *Kr4* on chromosome 1A (ZHENG *et al.* 1992), were identified later. Finally, a study elucidated that chromosome 1A, derived from the Chinese (Sichuan) tetraploid wheat *T. turgidum* L. cv. Ailanmai, carries a recessive allele for high crossability with rye (LIU *et al.* 1999). Genetic studies also indicated that *Kr* genes have different effects on wheat-rye crossability. For example, by testing the cultivars Chinese Spring (CS), Hope, and the substitution lines CS/Hope 5B and CS/Hope 5A, RILEY and CHAPMAN (1967) demonstrated that *Kr1* has a stronger effect than *Kr2*, whereas *Kr3* seemed weaker than the two other genes (KROLOW 1970).

To further explore the mechanisms controlling crossability in wheat, SNAPE *et al.* (1979) performed crosses between the wild barley *Hordeum bulbosum* and the wheat cultivars Chinese Spring and Hope as well as 21 substitution lines carrying individual chromosomes of Hope in the background of Chinese Spring. The results revealed that the *Kr1* and *Kr2* genes on chromosomes 5B and 5A that govern crossability between wheat and rye also are involved in controlling crossability between wheat and barley, although the percentage of crossability observed was significantly lower than with rye. Using crosses between Chinese Spring, Hope, and the entire series of substitution lines with the cultivated barley (*H. vulgare* L.) cv. Betzes, FEDAK and JUI (1982) also suggested that the homeologous alleles of the *Kr* genes on chromosome group 5 of Chinese Spring (5A, 5B, and 5D) favor crossability with additive effects.

In 1998, a new locus, named *SKr*, controlling crossability between wheat and rye was detected using a mapping population of 187 double haploid (DH) lines produced by anther culture from F₁ hybrids of a cross between the noncrossable (NC) French wheat cv. Courtot (Ct) and the Chinese crossable (C) cv. Chinese Spring (TIXIER *et al.* 1998). *SKr* was identified as a major QTL located on the distal end of the short arm of chromosome 5B within a confidence interval ranging from 8.7 to 20.9 cM (LAMOUREUX *et al.* 2002). In this population, the effect of *SKr* was stronger (22.1% of heritability) than the one of a QTL identified on 5BL (supposedly *Kr1*, 5.5% of heritability), whereas no significant effect was detected on 5AL (for *Kr2*). Moreover, the results indicated a 95% crossability rate for cv. Chinese Spring and ~10% for Courtot, suggesting that the Courtot genotype is

Kr1Kr1/kr2kr2, whereas Chinese Spring would be *kr1kr1/kr2kr2*.

Here, we report the construction of a high resolution genetic map at the *SKr* locus using a single seed descent (SSD) population derived from a cross between Courtot and a crossable DH line (MP98) that allowed us to assess the crossability phenotype as a single "Mendelian factor" and to demonstrate the major dominant effect of *SKr* on crossability. Synteny between wheat, barley, and rice was used to increase the density of markers and reduce the genetic interval around the *SKr* gene to 0.3 cM. BAC contigs from Chinese Spring were established with closely linked and cosegregating markers to lay the foundation for positional cloning of the gene. Finally, a SSR marker cosegregating with *SKr* was developed and its value for the exploitation of *SKr* in breeding was assessed in a collection of crossable lines used to produce primary triticales.

MATERIALS AND METHODS

Plant material: A mapping population was developed by crossing the noncrossable wheat cv. Courtot (Ct) with the highly crossable cv. Chinese Spring (CS). F₁ hybrids were used to produce a population of 187 doubled haploid (DH) by anther culture and colchicine treatment (FELIX *et al.* 1996; CADALEN *et al.* 1997). A highly crossable DH line (MP98) that carried Chinese Spring alleles at the *SKr* locus (D. LAMOUREUX, unpublished data) then was backcrossed with Ct followed by six generations of selfing to generate a SSD population of 618 individuals referred to hereafter as MP98 × Ct.

Crossable wheat progenies employed to increase the genetic basis of wheat in triticales breeding programs were evaluated to determine the usefulness of the SSR markers cfb306 and cfb341. The markers were tested on 11 lines originating from backcrosses between six noncrossable breeding varieties (Genesis, Balthazar, Oratorio, Altria, FD92017, and Ornicar) and the substitution line Ct(FukuhoKomugi 5B) referred to hereafter as Ct(FK 5B). In this latter line, chromosome 5B of the noncrossable Ct has been replaced by the 5B chromosome of the crossable Japanese cultivar FukuhoKomugi (FK) (GAY and BERNARD 1994). Two backcrosses were carried out with a self-fertilization generation between each backcross. A large number of F₂ plants were selected and crossed with rye for identifying the crossable *vs.* noncrossable progenies. For each F₂ selection step and for each variety, 12 plants were tested for crossability using rye cv. Dankowskie Nowe. One or more compatible progeny was tested with the two SSR markers cfb306 and cfb341. In addition, 66 varieties and landraces originating from different countries [*i.e.*, France (14 varieties), China (19 varieties and 6 landraces), India (1 variety), Japan (12 varieties), Mongolia (1 variety), Pakistan (2 varieties), and Algeria (11 varieties)] were tested to estimate the polymorphism rate of the two SSR markers. Finally, the Chinese Spring N5B/T5D (nullisomic 5B/tetrasomic 5D) line was used to identify markers specific for chromosome 5B, while the Chinese Spring deletion lines 5BS6-0.81–1.00, 5BS5-0.71–0.81, 5BS8-0.56–0.71, and 5BS4-0.43–0.56 were used to physically locate markers on the short arm of chromosome 5B.

Crossability evaluation: The percentage of crossability of a wheat plant with rye was determined as follows: two to four wheat ears with 20 florets per ear (and sometimes more for the 11 wheat crossable progenies) were emasculated 2–3 days

prior to anthesis. Apical and basal spikelets as well as all except the outermost florets of the remaining spikelet were removed to achieve uniform maturity throughout the ear. When receptive, stigmas were pollinated with fresh pollen collected from the rye cv. Dankowskie Nowe. The experiments were conducted in a greenhouse under natural photoperiod between March and July for the MP98 × Ct SSD plants. For the 11 crossable wheat progenies, means of data from greenhouse and from field conditions were used. Before and after pollination, emasculated ears were covered with bags to avoid uncontrolled pollination. Crossability was expressed as the ratio (in %) of seeds obtained 50 days after pollination divided by the number of pollinated florets for each ear examined. An average crossability percentage was then calculated for each plant.

BAC library screening: The *T. aestivum* cv. Chinese Spring BAC library (ALLOUIS *et al.* 2003; http://cnrgv.toulouse.inra.fr/en/library/genomic_resource/Tae-B-Chinese_spring) was screened by PCR using genome-specific primers corresponding to the ATPase1-5B gene/GBR0233 marker (F-5' CAGTGCCGTGCTTACCAGC 3' and R-5' AGCGTGTGCC CACTTGAGCT 3'). The primers were designed from the sequence of the Genoplante EST contig CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024 (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpSeq/>). In addition, genome-specific primers were designed to amplify the cfb306 (F-5' TAAAGCGGATGGGTCTTGT 3' and R-5' ATAAGATTACCTCGGGTGAA 3') and cfb309 (F-5' TAGGG CATATTTCCAACACT 3' and R-5' TAAGTCCGCGTATTAG CATT 3') markers. The primers were designed from the sequence of the BAC clone 1793L02 [GenBank accession (acc.) no. CT009585; CHANTRET *et al.* 2005]. For the ATPase1-5B/GBR0233 marker, PCR reactions were performed in a final volume of 10 µl containing 4 µl of diluted BAC DNA pools added to a mix containing 2 µl of buffer 10×, 0.5 µl of MgCl₂ (25 mM), 0.05 µl (5 units/µl) of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega), 0.2 µl of 10 mM dNTP mix, 0.125 µl of each primer (10 µM), and 3 µl of H₂O. Forty cycles of 30 sec at 95°, 45 sec at 65°, and 1 min 30 sec at 72°, followed by a final elongation of 5 min at 72° were performed. For the cfb306 and cfb309 SSR markers, real-time PCR reactions were performed on the LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science) in a final reaction volume of 10 µl containing 4 µl of diluted BAC DNA pools, 5 µl of premix SYBR2X, 0.125 µl of each primer, and 0.75 µl of H₂O. Forty cycles of 20 sec at 95°, 20 sec at 55° for cfb306, and 65° for cfb309, and 20 sec at 72°, were followed by a final elongation of 5 min at 72°.

BAC DNA extraction and Shotgun BAC sequencing: Shotgun BAC sequencing was carried out on the BAC clones 317L24 and 2163O14. BAC DNA was extracted by alkaline bacterial lysis (QIAGEN Plasmid Midi kit, Hilden, Germany) and 200 µl of BAC DNA was then subjected to shearing using the Hydroshear (Genemachines; THORSTENSON *et al.* 1988). The resulting fragments were separated on 1% agarose gel. DNA fragments between 500 bp and 3 kb were purified with the GfX PCR and gel purification kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and 2 µl of DNA was ligated into the pCR-Blunt-II-TOPO vector following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). The ligation product was then transformed into Electro-competent Top 10 *Escherichia coli* cells. Transformants were selected on agar medium containing 50 µg/ml kanamycin and 192 subclones (for 317L24 BAC clone) and 288 subclones (for BAC clone 2163O14) were picked for further DNA analysis. Subclones were sequenced from both ends with the SP6 (5' ATTTAGGT GACACTATAGAA 3') and T7 (5' TAATACGACTCACTA TAGGG 3') primers, and the sequence was assembled using the Pred/Phrap/Consed programs (EWING and GREEN 1998; EWING *et al.* 1998). Vector sequences were clipped using

CROSS_MATCH and the *E. coli* sequences were masked by comparing the obtained sequences with *E. coli* K12 sequence (GenBank acc. no. U00096).

Marker analysis and genetic mapping: PCR reactions for SSR markers were performed under the following conditions: 3 µl of DNA (10 ng/µl) was added to 2 µl of buffer 10× containing 31 mM MgCl₂, 4 µl of solution Q, 0.8 µl of Taq polymerase (QIAGEN), 0.4 µl of 10 mM dNTP mix, 1 µl of each primer (10 µM) in a total volume of 20 µl. Thirty cycles of 30 sec at 95°, 30 sec at 55°–65° depending on the primers T_m, and 30 sec at 72°, followed by a final elongation of 5 min at 72° were performed in a thermal cycler (MJ Research PTC-225). The SSR markers were detected by nonradioactive silver nitrate staining after 2-hr migration on an acrylamide gel 6% (Sigma-Aldrich) at 2000 V. The insertion site-based polymorphism (ISBP) markers were amplified as described in PAUX *et al.* (2006).

For RFLP analysis, 20 µl of genomic DNA (1 µg/µl) from the parental lines was digested with five restriction enzymes: *EcoRI*, *EcoRV*, *DraI*, *HindIII*, and *BamHI* (New England Biolabs, Beverly, MA) (4 units enzyme/µg DNA). The mix was completed with 3.5 µl specific enzyme buffer and H₂O to reach a final volume of 35 µl and incubated at 37° for 4 hr. Digested genomic DNA then was migrated on agarose gel 1% at 35 V for 16 hr. Alkaline transfer was performed during 24 hr on a nylon membrane (Bio-Rad, Hercules, CA) before Southern hybridization with ³²P radioactively labeled probes (Megaprime DNA Labeling System kit, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). A set of 18 barley ESTs and 3 RFLPs mapped in distal position on 5HS (STEIN *et al.* 2007) was kindly provided by N. Stein (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research-IPK, Gatersleben, Germany). The primer pair F-5' TCCTACCTCCATTCCTTT 3' and R-5' TCAAAAT GAATCGGAAGGGT 3' was used to amplify the STS-E41M48 marker utilizing the PCR conditions described in WILLIAMS *et al.* (2003).

Linkage analysis was performed with Mapmaker/exp v3.0b (LANDER *et al.* 1987) with a LOD 3.0 and the Kosambi centimorgan (cM) function (KOSAMBI 1944). To check for the effect of the *Kr1* and *Kr2* genes on crossability in the F₆ MP98 × Ct population, SSR markers located near the *Kr1* and *Kr2* loci on chromosomes 5BL (gwm213, gwm371, and gwm499) and 5AL (gpw2136, gwm617, gpw7007, and gwm666) 5AL, respectively, were evaluated. A coefficient of correlation was then calculated by replacing the Courtot allele (A) by 0 and the MP98 allele (B) by 1. The heterozygous alleles were considered as missing data.

RESULTS

***SKr* behaves as a major dominant gene in the MP98 × Ct SSD population:** The *SKr* gene was located previously by QTL mapping in a DH population of 187 individuals in a confidence interval of 8.7–20.9 cM at 12.7 cM from the distal end of chromosome 5BS containing the dl103, fba367, and gpw1072 markers (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002). A DH line, MP98, showing high crossability, was then backcrossed with cv. Courtot to develop a population of 618 individuals by SSD. All individuals were phenotyped for their crossability to rye and genotyped with markers for *SKr* on 5BS and for the *Kr1* and *Kr2* QTL on 5BL and 5AL, respectively (D. LAMOUREUX, unpublished data). Fifty individuals with recombination between the markers dl103 and gpw1072 on 5BS were selected for further fine mapping analysis

and to determine more precisely the effect and location of *SKr*:

The 50 SSD recombinants as well as the parents of the mapping population MP98 and Courtot were crossed with rye to reevaluate their crossability. MP98 revealed an average value of $70 \pm 11.32\%$ while Courtot showed a complete lack of crossability with no seed (0%) obtained after pollination with rye. Two clear classes were observed in the recombinant SSD (Figure 1): 25 individuals were NC with 15 of them at 0%, 1 at 1.25%, 1 at 1.67%, 2 at 2.5%, 2 at 3.75%, 3 at 5%, and 1 individual with 7.5% of crossability. Among the 25 crossable (C) SSD, 16 individuals had crossability values from 58.68 to 81.32%, which corresponds to the average and standard deviation crossability values of the crossable MP98 parent (Figure 1), whereas the nine other recombinants showed either smaller (42.5, 47.5, 48.33, 50, 55, and 56.43%) or larger (85, 87.5, and 92.5%) average crossability values (Figure 1). Previous analysis (TIXIER *et al.* 1998) suggested that Courtot carries the *Kr1Kr1/kr2kr2* alleles and Chinese Spring the *kr1/kr1/kr2kr2* alleles. Here, two main classes can be distinguished in the SSD population thereby suggesting that either *SKr* has a stronger effect than *Kr1* and the variations observed around the parental phenotypes originates from residual *Kr1* alleles or that Courtot carries a weak or recessive *kr1* allele and that, in this population, only the effect of *SKr* can be studied. To address this question, the parental lines and the 50 SSD individuals were genotyped with seven new SSR markers located near the *Kr1* (gwm213, gwm371, and gwm499) and *Kr2* loci (gpw2136, gwm617, gpw7007, and gwm666) on 5BL and 5AL, respectively. An analysis of correlation between the phenotype and the genotypes at the *SKr*, *Kr1*, and *Kr2* loci (supporting information, Table S2) did not indicate any significant correlation between crossability and the allelic composition at the *Kr1* or *Kr2* loci (Table S2). This suggests that Courtot may not carry a strong allele of *Kr1* and that other minor *Kr* genes at other locations in Courtot are responsible for the slight phenotypic variations, thereby confirming the previous observations of allelic variations for the crossability genes (FALK and KASHA 1983).

As expected for a single major gene in a SSD population after six generations of selfing, the two phenotypic classes showed a 1:1 (25:25) ($X^2 = 0$; $P < 0.01$, 1 d.f., NS) segregation. Interestingly, during fine mapping analysis, we detected four SSD lines with residual heterozygosity for the markers cosegregating and flanking the *SKr* gene on 5BS. All of them were noncrossable (Figure 1) and carried the Chinese Spring alleles for the *Kr1* markers demonstrating that *SKr* has a dominant effect on the inhibition of crossability. Thus, our results indicate that *SKr* is a single major dominant gene inhibiting crossability. The capability of assessing *SKr* as a single genetic locus in the SSD population

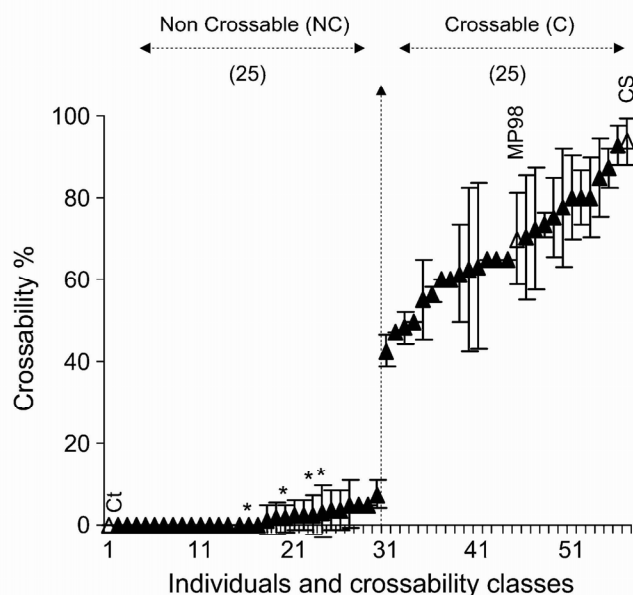


FIGURE 1.—Distribution of the crossability (in %) in the 50 recombinant SSD individuals selected at the *SKr* locus. Standard deviation and confidence intervals were calculated for each individual. The number of plants found in each of the two crossability classes, noncrossable (NC) and crossable (C) is indicated above the graph. The crossability values are illustrated for the reference parental lines Ct (0%), MP98 ($70 \pm 11.32\%$), and Chinese Spring (CS, $93.3 \pm 5.66\%$) (open triangles). The four asterisks denote the individuals showing residual heterozygosity at the *SKr* locus.

enabled us to localize further its position on the genetic map of chromosome 5BS.

High-density genetic mapping at the *SKr* locus using colinearity with rice and barley: To increase the number of markers at the *SKr* locus and identify the location of the gene in a defined genetic interval, markers mapped on wheat chromosome 5BS in the public databases were tested for polymorphism between MP98 and Courtot, the parents of the SSD mapping population. Eight markers, including four microsatellites, gwm234, gpw4098, wmc149, and gwm443; three RFLP markers, fba367, fbb276 (with *DraI* restriction enzyme), and bcd873 (with *BamHI* restriction enzyme); and a STS marker (E41M48), revealed polymorphism between the two cultivars. Linkage analysis using the 50 SSD recombinant individuals showed that these new markers are all proximal to the *SKr* gene (Figure 2A). To further increase the density of markers, find a distal marker to *SKr*, and identify a colinear region in rice, we first investigated the barley EST genetic map (STEIN *et al.* 2007) that consists of >1000 ESTs, including 117 on chromosome 5HS, instead of the 50 wheat ESTs that are only physically assigned to the most distal deletion bin of chromosome 5BS (5BS6-0.81–1.00; http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi; LINKIEWICZ *et al.* 2004) and are therefore less informative for identifying distal markers. Twenty-one barley markers

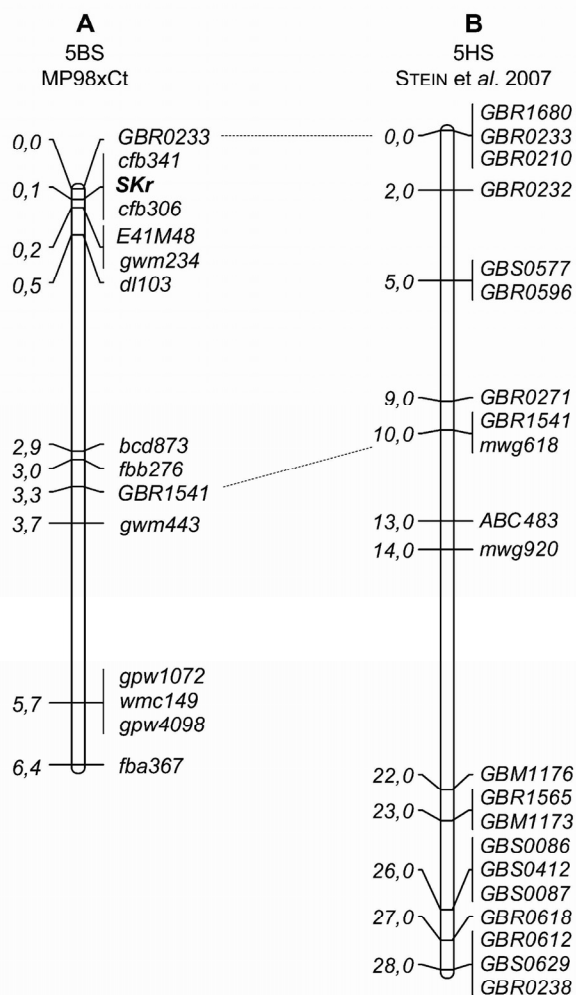


FIGURE 2.—Genetic maps and syntenic relationships at the *SKr* locus in wheat and barley. (A) Wheat 5BS genetic map (MP98 × Ct). (B) 5HS barley genetic map (STEIN *et al.* 2007).

(18 ESTs and three RFLPs) located in the distal region of 5HS (Figure 2B) were used as RFLP probes to test for polymorphism between MP98 and Courtot as well as for 5BS specificity using the nullisomic-tetrasomic line N5B/T5D and the 5BS6-0.81–1.00 deletion line. Twelve of these were specific to 5BS (Table S1); however, only 2 EST markers, GBR0233 and GBR1541 (GenBank acc. no. BU970461 and AL501780, respectively) exhibited polymorphism between the two parental cultivars and were mapped on the 50 SSD recombinant population. GBR1541 was mapped on the proximal side of *SKr* close to the RFLP fbb276, whereas GBR0233 was mapped at the end of chromosome 5BS on the distal side of the *SKr* locus (Figure 2A). Alignment of the GBR0233 sequence against the wheat EST database identified an EST (GenBank acc. no. BE606637; *E*-value 3×10^{-69} , score of 258 bp) assigned to the distal deletion bin (5BS6-0.81–1.00) of chromosome arm 5BS. Interestingly, BE606637 also belonged to a larger EST contig (NSFT03P2_Contig17621) of 2308 bp that contained another EST (GenBank acc. no. BE636954) assigned to the same

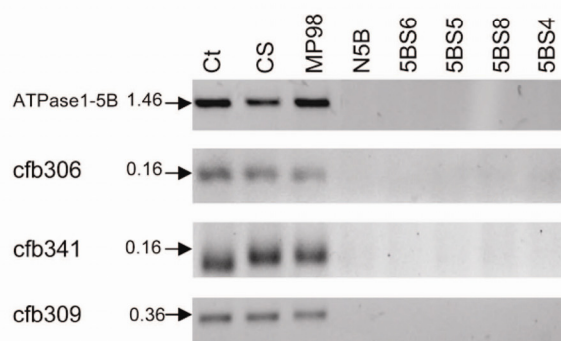


FIGURE 3.—Deletion mapping of four markers flanking *SKr*. Markers were amplified by PCR on Chinese Spring (CS) as a reference, on the nullisomic-tetrasomic line N5B-T5D (N5B), and on the deletion lines 5BS6-0.81–1.00 (5BS6), 5BS5-0.71–0.81 (5BS5), 5BS8-0.56–0.71 (5BS8), and 5BS4-0.43–0.56 (5BS4). The two parental lines Courtot (Ct) and MP98 were analyzed for polymorphism. The sizes of the amplicons, run on agarose gel 2%, are shown (in kilobases) on the left side of the figure.

distal 5BS deletion bin. Thus, these results confirmed the usefulness of using barley as a vehicle for wheat mapping and provided a distal marker to the *SKr* gene on 5BS.

To convert the GBR0233 RFLP marker into a PCR-based marker for future high-density mapping, the longest possible wheat homologous cDNA sequence in the databases was identified as a unigene EST contig (CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024) of 2707 bp showing 97% of identity (*E*-value 0.0) to the NSFT03P2_Contig17621 sequence. CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024 is a consensus sequence resulting from the assembly of several ESTs obtained from the wheat cultivar Recital (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpSeq/>). In hexaploid wheat, such unigene EST contigs usually correspond to consensus sequences formed from the three homeologous A, B, and D copies of a gene. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified between three types of sequences and specific primer pairs were designed for each of them to distinguish the putative 5B homeologous copy. One of the primer pairs (F-5' CAGTGCCGTGCTTACCAGC 3' and R-5' AGCGTGTGCCACTTGAGCT 3') amplified a product of 1464 bp (named ATPase1-5B) specific for chromosome 5B as shown, by nulli-tetrasomic and deletion mapping (Figure 3). PCR products of the same size were amplified from CS, MP98, and Courtot (Figure 3) and further sequenced [GenBank acc. no. FJ666342 (CS), FJ805255 (Ct), and FJ805254 (MP98)]. Sequence alignment showed 100% identity between the parental sequences even in the intronic regions, thereby hampering the development of a SNP-based marker for the GBR0233 locus.

The six new markers mapped at the *SKr* locus were incorporated with the phenotypic data into a linkage analysis providing, for the first time, a more detailed

position for the *SKr* gene at the end of chromosome 5BS (Figure 2A). The results demonstrated that the two markers, gpw1072 and dl103, originally used for selecting the 50 SSD recombinants, are actually proximal to the *SKr* gene. Therefore, the recombinants selected on this basis did not include all potential recombination events in the distal part of the locus and the genetic distances estimated between *SKr* and the markers distal to dl103 are, likely, underestimated (Figure 2A). Nevertheless, this first recombinant map was very useful in determining the relative order of the markers and in identifying markers flanking the *SKr* gene for future map-based cloning with new populations.

Comparison of the two mapped EST sequences GBR0233 and GBR1541 as well as the other barley and wheat ESTs revealed the relationship between the distal region of chromosome 5B and 5HS and the rice pseudomolecules. The analysis identified homologous genes on 6 different rice chromosomes (r1, r2, r3, r9, r10, and r12) with a majority on chromosome 12 (Table S1) as observed previously by SARMA *et al.* (2000) and LINKIEWICZ *et al.* (2004). *Os12g44150*, the rice homolog to GBR0233, which is the closest marker to *SKr*, is annotated as a *plasma membrane ATPase 1* located at the distal end of chromosome 12L, whereas the GBR1541 homologous sequence is annotated as an *Enolase2* gene on chromosome 10. Thus, these results suggest that the orthologous region to *SKr* in rice is on chromosome 12L.

The 5B homeologous *GSP* locus is linked closely to the crossability gene *SKr*: The rice homologous gene to GBR0233 near *SKr*, *Os12g44150*, is separated by only two genes in the rice genome annotation from a group of genes (*Os12g44180–Os12g44250*) that were identified previously as orthologous to the regions carrying the grain softness protein (*GSP*) gene on the short arm of wheat chromosomes group 5 (SOURDILLE *et al.* 1996; TURNER *et al.* 1999; IGREJAS *et al.* 2002; CHANTRET *et al.* 2004) (Figure 4) and the short arm of chromosome 5H in barley (CALDWELL *et al.* 2004). To assess whether *SKr* is in the vicinity of the *GSP* locus on 5B and derive new markers, SSR and insertion site-based polymorphism (ISBP) markers (PAUX *et al.* 2006) were designed from the sequence of the BAC clone 1793L02 (GenBank acc. no. CT009585) identified by CHANTRET *et al.* (2005) on chromosome 5B of cv. Renan. Out of 17 ISBP and 13 SSR markers, 5 SSR markers (cfb301, cfb302, cfb303, cfb306, and cfb309) and 9 ISBPs (cfp187, cfp188, cfp190, cfp191, cfp192, cfp193, cfp194, cfp195, and cfp1005) were specific for 5B (data not shown). Cfb306, the only marker showing polymorphism between Ct and MP98 on acrylamide gel, was found in complete segregation with *SKr* in the 50 recombinant SSD population (Figures 2A and 4), thereby indicating a very close linkage between the *SKr* and the *GSP* loci on chromosome 5BS. As observed for the GBR0233 marker, the polymorphism in the *SKr*

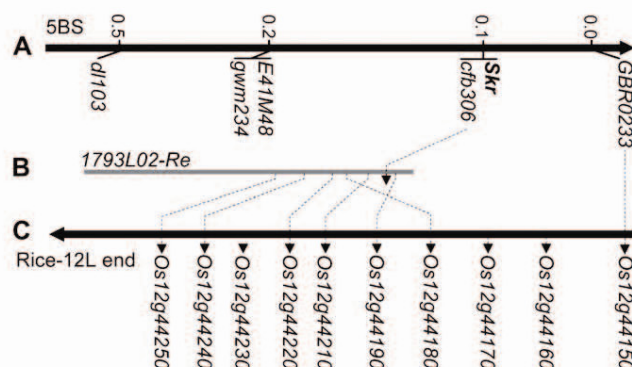


FIGURE 4.—Genetic mapping at the *SKr* and the 5B homeologous *GSP* loci on 5BS and microcolinearity with chromosome 12L of rice. (A) Genetic map of the telomeric end of chromosome 5BS in the MP98 × Ct SSD recombinant population. (B) BAC clone 1793L02 of cv. Renan (Re) (CHANTRET *et al.* 2005) carries a microsatellite (cfb306) completely linked to *SKr*. (C) Schematic representation of the telomeric end of rice chromosome 12L carrying six genes conserved with BAC clone 1793L02 of *T. aestivum* cv. Renan.

region appeared extremely low, suggesting selective constraints in this region during domestication and/or selection. Finally, these results indicate very high microcolinearity between wheat 5BS and rice chromosome 12L in the *SKr* region (Figure 4) and suggest that the region around *SKr* which represents only 54 kb in rice may be of a reasonable size and thus amenable to efficient map-based cloning in wheat.

Toward the establishment of a physical map spanning the *SKr* locus: To initiate physical mapping at the *SKr* locus and establish a contig spanning the gene from cv. Chinese Spring, we used the cfb306 and cfb309 markers derived from BAC 1793L02 as well as the ATPase1-5B (derived from GBR0233) marker (Figure 5) to screen pools of the cv. Chinese Spring BAC library (ALLOUIS *et al.* 2003) by PCR. Five positive BAC clones were identified. BACs 46I23 (115 kb), 173K03, and 1836D12 carried the two SSR markers cfb309 and cfb306, whereas BAC 2163O14 (165 kb) carried only cfb309, indicating that this BAC clone is located upstream of the three other BACs (Figure 5B). A single BAC clone 317L24 was identified with the ATPase1-5B specific primers. These results allowed us to construct an initial physical BAC contig in the *SKr* region (Figure 5).

Shotgun BAC sequencing of the BAC clone 317L24 was performed at 0.9× sequence coverage. After assembly, 21 contigs and 14 singletons representing 58467 bp of sequence were obtained and compared with the sequence of the rice pseudomolecules (<http://rice.plantbiology.msu.edu/blast.shtml>) using BLASTn. One contig (Ctg19) carries a gene corresponding to the plasma membrane ATPase marker GBR0233 orthologous to the rice gene *Os12g44150* (Table 1). Interestingly, two other contigs (ctg20 and 09, Table 1) carry genes homologous to the rice genes *Os12g44160*

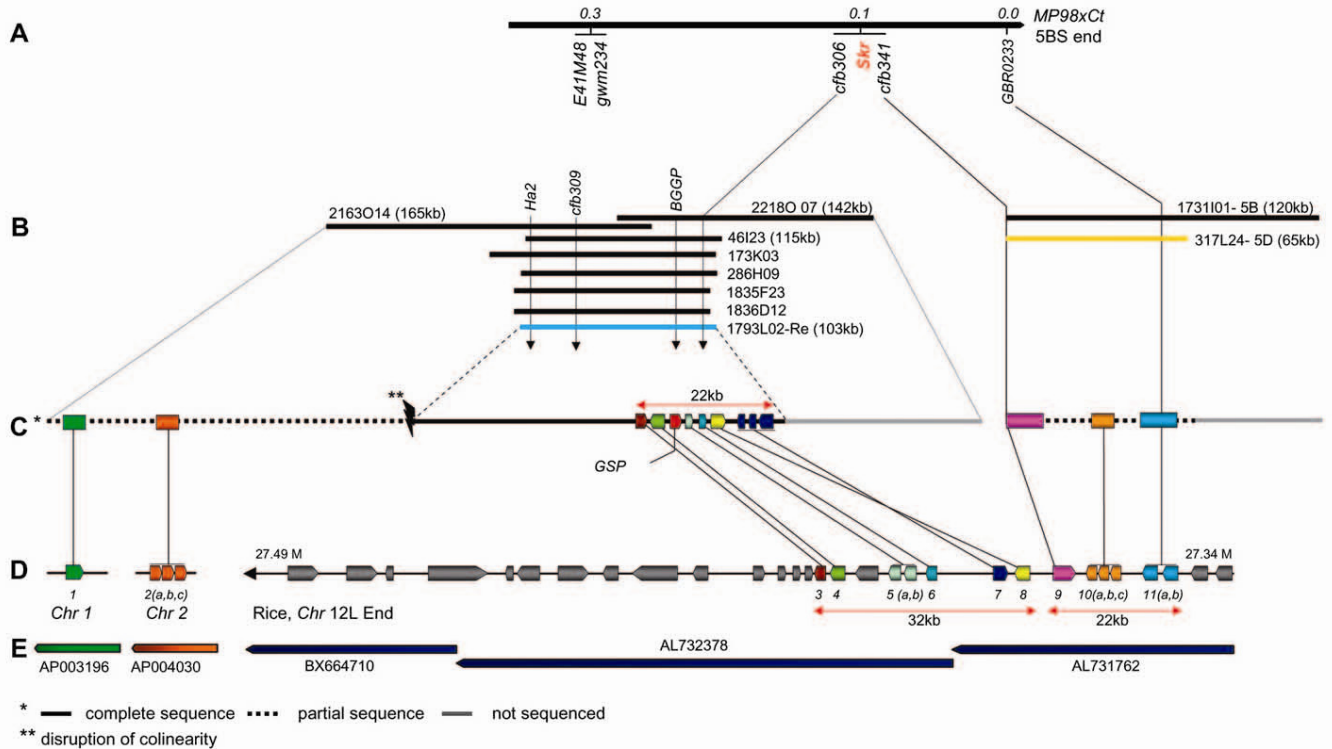


FIGURE 5.—Extended genetic and physical maps at the *SKr* locus and synteny with rice. (A) Genetic map of the *SKr* locus on wheat chromosome arm 5BS. (B) Physical map at the *SKr* locus on wheat chromosome 5BS. (C) Detailed representation of the BAC clones identified at the 5B homeologous *GSP* (1793L02 in blue, (CHANTRET *et al.* 2005, 2008) and *SKr* loci. The gene order on partially sequenced BAC 317L24 (in orange) corresponds to the order established on the genetic map for *cfb341* and *GBR0233*. *GSP-1* (grain softness protein). (D) Colinearity with genes located on rice chromosomes 1, 2, and 12L. (E) Rice BAC clones associated with the different wheat orthologous genes on chromosome 5BS. The 11 rice genes on chromosomes 1, 2, or 12 are annotated as follows: (1) *Os01g14180*: expressed protein; (2 a, b, c) *Os02g13990*: U2 small nuclear ribonucleoprotein A (U2A); (3) *Os12g44250*: vesicle-associated membrane protein; (4) *Os12g44240*: N-acetylglucosaminyltransferase; (5 a, b) *Os12g44220*: ATPase; (6) *Os12g44210*: ATPase, AAA family domain containing protein; (7) *Os12g44190*: ATPase 3; (8) *Os12g44180*: nodulin; (9) *Os12g44170*: pentatricopeptide; (10 a, b, c) *Os12g44160*: oxidoreductase; and (11 a, b) *Os12g44150*: plasma membrane ATPase. Gray: other genes present on rice chromosome 12.

and *Os12g44170* (Table 1), which are consecutive to *Os12g44150* in the rice genome annotation. Thus, BAC 317L24 carries three wheat genes orthologous to three rice genes that are located immediately upstream of the six genes (*Os12g44180* to -44250) identified previously as orthologous to the 5B homeologous *GSP* locus (Figure 5). To further investigate microcolinearity upstream the *GSP-5B* locus, we shotgun sequenced the BAC clone 2163O14 to 0.73× sequence coverage. Eighty-eight contigs and two singletons representing 122,365 bp of sequence were obtained and compared with the rice pseudomolecules using BLASTn. Two contigs (Ctg46 and Ctg101) carry genes corresponding to the rice genes *Os01g14180* and *Os02g13990* on rice chromosomes 1 and 2, respectively. These results indicate complete disruption of microcolinearity between the *SKr/GSP-5B* locus on wheat chromosome 5BS and rice chromosome 12L around the *U2 small nuclear ribonucleoprotein A* gene (*Os02g13990*) and upstream. Therefore, it is unlikely that beyond this limit the gene content of the equivalent region in rice will provide additional markers for high-density mapping at the *SKr* locus.

In an attempt to develop additional markers in the distal part of the *SKr* gene, the shotgun sequences of BACs 317L24 and 2163O14 were used to design 10 and 20 ISBP and 26 and 25 SSRs markers, respectively. Only 1 SSR marker named *cfb331* (F-5' TAAT TAGGGCCTGC TTCTGCT 3' and R-5' CAGATGCTTCCTTCATCCAAA 3') from BAC 317L24 showed polymorphism between Courtot and MP98. The marker revealed two fragments (*cfb331-5B* and *cfb331-5D*) that were assigned to 5B and 5D by nulli-tetrasomic N5B-T5D/N5D-T5A analysis (data not shown). The 5B-specific locus was mapped in complete linkage with the *SKr* gene and the *cfb306* SSR marker. Both fragments were cloned and sequenced (GenBank acc. nos. FJ666344 for *cfb331-5B* and FJ666345 for *cfb331-5D*). The results showed that *cfb331-5D* is completely identical to the BAC 317L24 shotgun sequence, whereas six SNPs were found with the *cfb331-5B* sequence. Thus, this indicates that BAC 317L24 originates from chromosome 5D and not from 5B and that it cannot be linked to the physical contig corresponding to the 46I23, 173K03, and 2163O14 BAC clones (Figure 5B). Nevertheless, this allowed us

TABLE 1

Comparative sequence analysis between the wheat genomic shotgun sequences from the BAC clones 317L24 (ctg: 19, 20, 09) and 2163O14 (ctg: 46, 101) and the rice genome sequence

Sequence name	BAC clone	GenBank acc. no.	Size (bp)	TIGR gene	Rice chr.	Expect	Identity (%)	Annotation TIGR v.6
Ctg19	317L24	FJ666343	4484	Os12g44150	12	1.5e255	70	Plasma membrane ATPase1
Ctg20	317L24	FJ666341	7208	Os12g44160	12	8.0e124	79	Oxidoreductase
Ctg09	317L24	FJ666346	1448	Os12g44170	12	5.7e163	82	Pentatricopeptide
Ctg46	2163O14	GQ219778	1293	Os01g14180	1	2.1e11	76	Expressed protein
Ctg101	2163O14	GQ219777	3091	Os02g13990	2	1.5e40	66	U2 small nuclear ribonucleoprotein A

to design a 5B-specific STS marker renamed *cfb341* (F-5' TAATTAGGGCCTGCTTCTGCT 3' and R-5' TTCCTTCATCCAAAGAGACTGG 3') (Figures 3 and 5A) that can be used now to rescreen the Chinese Spring BAC library. Interestingly, the *cfb341* microsatellite is located within a gene (in contig 09, GenBank acc. no. FJ666346; Table 1) showing homology to the pentatricopeptide gene *Os12g44170* in rice (Figure 5E and Table 1). Our results thus indicate that two markers (*GBR0233* and *cfb341*) corresponding to two genes (*plasma membrane ATPase1* and *pentatricopeptide*) separated only by 6 kb in rice are present on a single BAC clone (317L24) and are separated by at least one recombination event on 5BS. This suggests a high recombination rate in the distal *SKr* region and a physical-to-genetic distance ratio favorable for map-based cloning of the *SKr* gene (Figure 5).

To complete the physical map at the *SKr* locus on 5BS, a second screening of the Chinese Spring BAC library was initiated by hybridization. Four probes were used: Ha2 (low copy sequence located at 19.97 kb upstream of the *cfb309* marker), BGGP (corresponding to *N-acetylglucosaminyltransferase* gene located at 16.71 kb upstream of the *cfb306* marker), SG317L24P2-E01 (corresponding to the partial sequence of the *pentatricopeptide* gene carrying *cfb341*), and ATPase1-5B (the partial genomic sequence of the *plasma membrane ATPase1* gene) (Figure 5). Four new BAC clones were identified in addition to the BAC clones found previously in the first PCR screening. BACs 286H09 and 1835F23 were obtained with both the Ha2 and BGGP probes. BAC 2218O07 (120 kb) was revealed with the BGGP probe only, whereas BAC 1731I01 (142 kb) was obtained with both the SG317L24P2-E01 and ATPase1-5B probes (Figure 5). The 5B origin of the 1731I01 BAC clone was confirmed by PCR using the 5B-specific *cfb341* marker. With this result, we were able to establish a contig of ~300 kb on the proximal side of *SKr* and identify a BAC clone (1731I01) of 120 kb on the distal side. BAC end sequencing of the 1731I01 clone showed that *cfb341* is located at the end of the BAC clone and, therefore, that there is still a gap between the two physical contigs.

Thus, with this work, we have identified new markers and established the foundation for designing additional ones by shotgun sequencing the 46I23 and 2218O07 BAC clones. These markers will be used to identify recombinants in novel high-density mapping populations to locate eventually the *SKr* gene within a genetic and physical interval for final map-based cloning.

The *cfb306* and *cfb341* markers are efficient tools for introducing high crossability alleles in elite wheat varieties: The *cfb306* and *cfb341* SSR markers are linked totally with the *SKr* gene in our population and, therefore, represent potentially good markers for introducing crossability alleles of *SKr* into breeding programs that aim at increasing the genetic basis of wheat for the production of primary triticale or for crossing with other related species. To evaluate their usefulness in such applications, BC2 lines produced from wheat elite varieties that serve as parents in primary triticale production were tested with the two markers. The BC2 panel consisted of 11 crossable progenies resulting from six noncrossable elite wheat varieties that had been crossed with Ct(FK 5B), a crossable substitution line carrying a chromosome 5B originating from the Japanese wheat accession FukuhoKomugi (FK) (GAY and BERNARD 1994) (Figure 6). The results indicate complete association between the two SSR markers and crossability with rye except for one individual (01BB15-2-1 in *Oratorio* × *Ct(FK 5B)*) that showed recombination between *cfb306* and crossability (Figure 6) and no polymorphism for *cfb341*. However, phenotyping of this line indicated high variability (ranging from 6 to 58%) and these results need to be confirmed. Together, these data confirm that the two SSR markers *cfb306* and *cfb341* are located very close to the crossability gene *SKr* on chromosome 5BS and strongly support the genetic mapping data obtained with the 50 SSD recombinant population. They also revealed high allelic variability for the *cfb306* marker with six different alleles found in seven different lines. In contrast, only two alleles were observed with *cfb341* (Figure 6) and, to confirm this feature, a polymorphism test was carried out with the two markers on 66 wheat

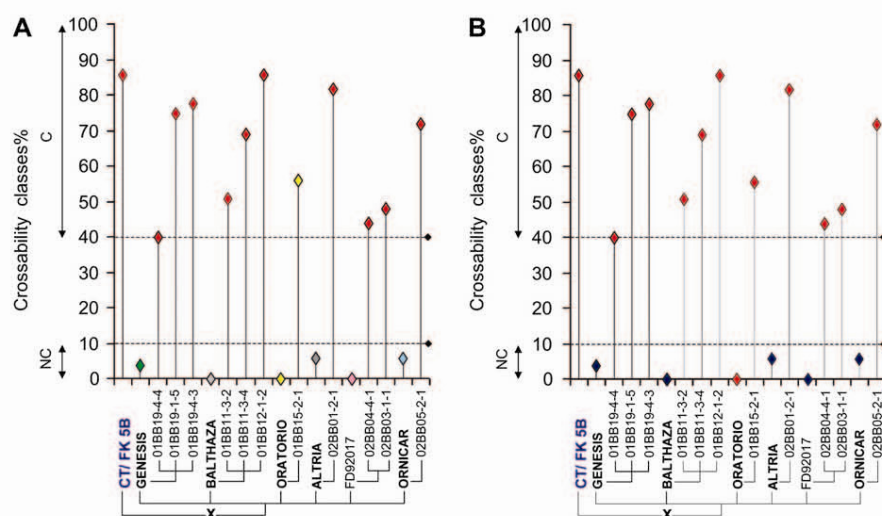


FIGURE 6.—Graphical representation of the phenotypes and genotypes for all parents and progenies of the different crosses with Ct(FK 5B). (A) Genotyping with the cfb306 marker. (B) Genotyping with the cfb341 marker. The crossability ratio (in %) is represented on the Y axis, whereas the parental lines and the crossable BC2 progenies identified from each cross are indicated on the X-axis. The colored dots represent the different alleles for a given marker.

varieties and landraces originating from different regions of the world (data not shown). For cfb341, only two alleles were detected in 65 varieties and a third allele was found for a wheat variety originating from Pakistan. For cfb306, 18 alleles were found in the 66 lines confirming the extreme rate of polymorphism of this SSR marker and its interest for breeding.

DISCUSSION

So far, wheat crossability genes have been identified either by deletion or substitution lines analyses (LEIN 1943; RILEY and CHAPMAN 1967; LANGE and RILEY 1973; SITCH *et al.* 1985) with very few linkage analyses studies thereby making it difficult to discriminate precisely between the relative effects of the different *Kr* genes, especially for those located on the same chromosomes. The first evidence for the presence of a crossability gene on 5BS came from the telocentric mapping studies of SITCH *et al.* (1985) in which the crossability of wheat monotelosomic CS lines with *Hordeum bulbosum* revealed that a gene inhibiting crossability is present on the short arm of chromosome 5B in addition to the *Kr1* gene already identified on 5BL. Subsequently, the *SKr* locus was identified as a major QTL (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002) inhibiting crossability of wheat to rye on 5BS; however, at that time, it could not be mapped with precision and its relative effect to *Kr1* that was revealed as a small QTL in the same study remained unclear. Here, using a SSD population, we were able to score *SKr* as a single Mendelian factor and demonstrate that it acts as a dominant gene inhibiting crossability. This confirms the first results of RILEY and CHAPMAN (1967) on the *Kr1* mode of action wherein it was concluded that crossability is not promoted by recessive alleles but inhibited by dominant alleles. Later studies performed to determine the site of action of the *Kr1* and *Kr2* genes (LANGE and

WOJCIECHOWSKA 1976; JALANI and MOSS 1980; JALANI and MOSS 1981) also demonstrated that dominant alleles from Hope, CS/Hope 5B, and CS/Hope 5A result in inhibition of the pollen tube growth between the style base and the embryo sac. Finally, CAMERON and REGER (1991) showed that a soluble, dialyzed lysate extracted from the ovaries of Hope and CS/Hope 5B inhibits rye pollen tube elongation significantly more than a similar lysate from Chinese Spring ovaries. It remains to be proven if *SKr* also inhibits the rye pollen tube growth and acts through the same inhibitory pathway as the other *Kr* genes. Cloning and characterization of the *SKr* and *Kr1* genes (G. MOORE, personal communication) on chromosome 5B will help in determining whether the *SKr* and *Kr1* genes on 5B act in additive or complementary ways.

Our results suggest also that in Courtot, *SKr* has a stronger effect than *Kr1* on crossability of wheat to rye. RILEY and CHAPMAN (1967) showed that with 74.3% of crossability in Chinese Spring, 6.4% in CS/Hope 5B, 26.2% in CS/Hope 5A, and 0% in Hope, chromosome 5B of Hope that carries *Kr1* has a stronger inhibition effect than chromosome 5A with *Kr2*. However, it is important to note that at that time, the effect of *SKr* on 5BS had not been identified. To our knowledge, it is not known whether Hope carries *SKr*; therefore, it is possible that the low crossability observed in the CS/Hope 5B substitution line also originates from *SKr* and that this was undermined so far in the absence of markers for *SKr* on 5BS. Alternatively, it is possible that Courtot carries a weak *Kr1* allele and that the MP98 × Ct population is not suitable for comparing the relative strength of the two genes. This also could explain why *SKr* was identified as the main QTL for crossability in the original QTL analyses whereas *Kr1* was detected only as a minor QTL (TIXIER *et al.* 1998; LAMOUREUX *et al.* 2002). One of the difficulties in comparing the different crossability studies is that even if they used the same

crossable line Chinese Spring, they were performed with different noncrossable varieties for which the allelic variation at the *SKr* and *Kr* loci was not assessed systematically. To address this question, it would be interesting in the first place to produce and compare ditelosomic 5BL and 5BS lines from Courtot and Hope. The markers developed in this study and future fine mapping at other *Kr* loci would be useful to better distinguish the relative effects of the different genes in the Hope \times CS populations.

Together with previous studies (KROLOW 1970; FALK and KASHA 1983), our results indicate allelic variability among the different crossability genes. At the *Kr1* locus, for example, FALK and KASHA (1983) demonstrated that Atlas66 and Hope had stronger inhibitor alleles than Cheyenne and Chinese Spring. For *SKr*, we propose that Chinese Spring as well as Fukuhogomugi carry weak alleles the effect of which can be detected only by using ditelosomic mapping (SITCH *et al.* 1985) and that most of the noncrossable European wheat varieties, such as Courtot and the six other French varieties tested here, carry strong inhibiting *SKr* alleles. In a study of 1400 varieties, ZEVEN (1987) showed that most bread wheat varieties or landraces displaying high crossability with rye originate from China, Japan, East Siberia, and Iran. This raises interesting questions on the evolution of crossability in wheat.

Both tetraploid and hexaploid wheat possess genetic systems that regulate crossability with rye; however, it is not clear yet whether the same genes are involved in both species. LIU *et al.* (1999) mapped the major crossability genes in tetraploid wheat to chromosomes 1A, 6A, and 7A and suggested that crossability in Chinese tetraploid and hexaploid wheat may be controlled by different genetic systems. If tetraploid wheat, indeed, exploits a different genetic system, then it brings into question the origin of the hexaploid wheat system. The fact that the Asian wheat pool is highly crossable compared to the European pool suggests that the inhibition barrier is an ancestral state found in the Fertile Crescent where rye was domesticated at the same time as wheat and both have been maintained and cultivated in Europe ever since. In contrast, in Asia where the wheat population structure is clearly different (BALFOURIER *et al.* 2007), rye has never been cultivated in high amount in the vicinity of wheat possibly allowing the development of mutation and allelic variants that became crossable with rye. A systematic analysis of crossability with rye in tetraploid and hexaploid wheat core collections (BALFOURIER *et al.* 2007) would facilitate the study of the origin of high crossability in the Asian wheat pool. Preliminary data indicate the SSR markers cfb306 and cfb341 can be used also to investigate the tetraploid wheat pool and that cfb306 is highly polymorphic in *T. durum* accessions (4 different alleles among five varieties from Algeria, data not shown).

High-density mapping using microcolinearity with barley as a vehicle: Using a SSD recombinant popula-

tion, we were able to mendelize the crossability gene *SKr* and localize it in a small (<1 cM) genetic interval with five closely linked molecular markers at the telomeric end of the short arm of chromosome 5B. Our result indicates that the previous selection of the 50 SSD made by D. LAMOUREUX, (unpublished data) was performed incorrectly because it was based on the assumption that *SKr* was located between the dl103 and gpw1072 markers. Thus, it is clear that the current estimates of genetic distances around *SKr* are biased and that the order of the markers very closely linked or completely segregating with *SKr* remains to be confirmed with a new population. However, the association study performed with the wheat lines used for primary triticale production provides strong evidence for the location of *SKr* between the gwm234 and GBR0233 markers in close vicinity of the cfb306 and cfb341 markers.

The saturation of the target gene region by molecular markers is an important step in map-based cloning projects. Comparative studies had reported good colinearity between wheat and rice at large scale (MOORE *et al.* 1995; FEUILLET and KELLER 2002; SORRELLS *et al.* 2003) and more complex relationships at the subcentimorgan or sequence level (BENNETZEN and RAMAKRISHNA 2002; FEUILLET and KELLER 2002) with generally better conservation in the proximal regions (SANMIGUEL *et al.* 2002; YAN *et al.* 2003) compared to the distal regions (KILIAN *et al.* 1997; FEUILLET and KELLER 1999; LI and GILL 2002; LINKIEWICZ *et al.* 2004). The *SKr* gene is located in a very distal position on 5BS and low-resolution mapping indicates high disruption of colinearity between wheat and rice in this region making it difficult to use rice as a new source of markers in the first place. MOORE *et al.* (1995) and SORRELLS *et al.* (2003) showed that the wheat homeologous group 5 represents one of the most complex syntenic relationships with rice. LINKIEWICZ *et al.* (2004) constructed high-density deletion bin maps of wheat chromosomes 5A, 5B, and 5D, including a total of 2555 loci and revealed that group 5 is, generally, colinear with chromosomes 12, 9, and 3 of rice. Other studies reported that the chromosome arm 5BS is colinear with rice chromosome 11 (LAMOUREUX *et al.* 2002). However, in our study the lack of mapped genes near *SKr* prevented the identification of the rice orthologous region for new marker design in the first place.

The development of high-density EST maps in barley (STEIN *et al.* 2007) enabled us to circumvent this problem and served as an efficient bridge to reach sufficient resolution and establish finally a close relationship with rice chromosome 12. This illustrates the importance of developing barley resources to support wheat genomics projects and reinforces the fact that barley is the best model for wheat. Barley belongs to the same tribe, shares the same number of chromosomes, and diverged from wheat only 10–14 million years ago, in contrast to Brachypodium (BOSSOLINI *et al.* 2007) and rice (WOLFE *et al.* 1989) that diverged from wheat 30–50 million years

ago. As a diploid, EST mapping in barley is more efficient than in bread wheat in which genome-specific markers need to be developed for each homeologous copy of a gene. The establishment of high throughput gene mapping platforms in barley (OPA1; <http://harvest.ucr.edu/Barley1.htm>) together with the construction of anchored physical maps of wheat and barley through international consortia (www.wheatgenome.org; www.barleygenome.org) will greatly support map-based cloning in wheat in the near future. Several map-based cloning projects in wheat have revealed the limits of using rice or *Brachypodium* as genome models to identify candidate genes in particular for fast evolving pathways such as disease resistance (KELLER *et al.* 2005). It will be interesting to see whether crossability genes are conserved between wheat and rice or *Brachypodium*. At the moment, we can only speculate about the possible candidates found in the *SKr* orthologous rice region on chromosome 12L. Genetic and biochemical analyses both suggest that inhibition of crossability is an active mechanism and that the crossability genes may encode a product that stops the penetration of the rye pollen tube between the style base and the embryo sac, *i.e.*, just before fertilization (LANGE and WOJCIECHOWSKA 1976; JALANI and MOSS 1980; JALANI and MOSS 1981). In dicots, molecular analyses of self-incompatibility and interspecies pollen tube rejection have identified key roles for *S*-RNase genes (FRANKLIN-TONG and FRANKLIN 2003) as well as receptor kinases (ESCOBAR-RESTREPO *et al.* 2007). In rice, a number of studies have indicated loci involved in the control of intersubspecific and interspecific reproduction barriers through fertilization prevention, hybrid male sterility, embryo sac abortion, or hybrid breakdown. They were identified on rice chromosomes 1 (*S24*, KUBO *et al.* 2008), 2 (*S32*, LI *et al.* 2007), 5 (*S31*, *S35*, KUBO *et al.* 2008; ZHAO *et al.* 2007), 6 (*S1*, *S5*, *esa-1*, LIU *et al.* 2000; QIU *et al.* 2005; CHEN *et al.* 2008), and 12 (*esa-2* and *esa-3*, LIU *et al.* 2000), but not in the orthologous region to *SKr*. *S5* has been cloned recently (CHEN *et al.* 2008) and was shown to encode an aspartic protease conditioning embryo-sac fertility. None of the nine genes colinear between wheat and rice at the *SKr* locus revealed homology to this type of gene and it will be interesting to see whether *SKr* corresponds to a new type.

Toward map-based cloning of *SKr*: In this study, we mapped new molecular markers and established 2 physical contigs of ~300 kb and 120 kb at the *SKr* locus. Because the current SSD population was not selected with flanking markers, we cannot be certain that the physical contigs actually flank the gene. However, the association analysis performed with the *cfb306* and *cfb341* markers makes us confident that the two markers are extremely close to *SKr* and that they will be very useful to select recombinants in a new large population mapping. To support our data, we also mapped the *gpw1072*, *gwm234*, *cfb306*, and *cfb341* markers using 94

individuals of a Renan \times CS F₂ population (SAINTENAC *et al.* 2009) (data not shown). The results confirmed the distal position of *gwm234*, *cfb306*, and *cfb341* compared to *gpw1072* and indicated recombination between the *cfb306* and *cfb341* markers. This demonstrates that even though the SSD map underestimated recombination rates and genetic distances, it represents a good basis for further high-resolution mapping of the *SKr* gene. Together with the identification of a recombination between *cfb341* and the GBR0233 marker within a single BAC in the SSD population, these results also suggest high recombination rates in the *SKr* region, which should greatly support efficient map-based cloning of the gene. We are developing currently a heterogeneous inbred family population (TUINSTRA *et al.* 1997) using a line (SSD254) heterozygous for the molecular markers GBR0233, *cfb341*, *cfb306*, *gwm234*, *E41M48*, *d1103*, *fb267*, and *bcd873* that flank *SKr* (W. ALFARES and C. FEUILLET, unpublished data) and carrying the alleles from Courtot for the other loci on 5BS.

The fact that the BAC contigs at the *SKr* locus span only 54 kb in rice suggests that the physical distance between the two wheat contigs may not be too large and that a single walking step could be sufficient to link both contigs. Currently, we are screening the Chinese Spring BAC library with markers derived from the BAC ends of these contigs to establish a single contig in the region. Finally, one of the potential difficulties that we may face in the final steps of map-based cloning concerns the low polymorphism observed in the *SKr*/GSP-5B region on 5BS. Only one out of 30 markers originating from the BAC 1793L02 showed polymorphism between CS and Ct and no single sequence difference was found over 1464 bp of sequence including an intronic region for the *ATPase1-5B* gene. This is very similar to the observations of CHANTRET *et al.* (2005, 2008) who found only 58 SNPs and a few short indels between the *T. aestivum* and the *T. turgidum* orthologous sequences at the GSP locus on chromosome 5BS. A possible explanation is that deletions in some of the genes present in this region are highly deleterious and have been counter-selected through the domestication and selection processes.

A new and efficient diagnostic marker for crossability: Until now, the introduction of crossability genes into noncrossable wheat elite lines has been performed mostly by backcrossing without markers. This is laborious, lengthy, and rather inefficient because crossability with rye is recessive and a self-fertilization generation is required to enable the identification of plants carrying the crossability gene before further use. In addition, to avoid losing one generation time in the breeding process, crossability testing in the absence of markers requires that all F₂ plants are crossed with rye (12 per population) and with the recurrent wheat parent when only 25% of the F₂ plants will be eventually crossable

with rye. Thus, markers can greatly improve the efficiency and reliability of the primary triticale backcross process by allowing the identification of crossable progenies without self-fertilization and testcrosses with rye. Our results reveal that cfb306, which is closely linked to *SKr*, has all of the characteristics of an efficient marker for the introduction of crossability in wheat germplasm through marker-assisted selection. As a SSR marker, it is amenable to high throughput genotyping and its high level of allelic polymorphism will allow its implementation in a large variety of wheat lines. Finally, our results support previous data suggesting that the crossability genes in wheat exhibit high levels of allelic variability. Thus, to ensure the efficient introduction of crossability into wheat varieties, a careful analysis of the allelic composition of the recipient lines at the major crossability loci and, in particular at *Kr1* and *SKr*, will be needed. The markers developed for *SKr* in this study and for other loci (*Kr1*, G. MOORE, personal communication) will be extremely useful in this regard.

We are very grateful to Delphine Boyer, Alain Loussert, Jacqueline Philippon, and Bouzid Charef for the excellent and dedicated technical support they have provided all along this project. We also thank Philippe Leroy, Frederic Choulet, Etienne Paux, Sébastien Faure, and Jérôme Salse for their support with the bioinformatics analysis and for fruitful discussions. In addition, we acknowledge Nils Stein (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany) for providing us with the barley EST and RFLP probes and Boulos Chalhoub (Unité de Recherche en Génomique Végétale, France) for providing us with BAC clones for the *Ha* locus in Chinese Spring. The authors thank the GIE Triticale for allowing the use of the crossable wheat progenies for validation of the SSR markers in this study. For editing and critical review of the manuscript, the authors thank Graham Moore, Kellye Eversole, and Pierre Barret. This research has been funded by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, France) and from the University of Aleppo (Syria).

LITERATURE CITED

- ALLOUIS, S., G. MOORE, A. BELLEC, R. SHARP, P. FAIVRE RAMPANT *et al.*, 2003 Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germplasm 'Chinese Spring'. *Cereal Res. Commun.* **31**: 331–338.
- BACKHOUSE, W. O., 1916 Note on inheritance of crossability. *J. Genet.* **6**: 91–94.
- BALFOURIER, F., V. ROUSSEL, P. STRELCHENKO, F. EXBRAYAT-VINSON, P. SOURDILLE *et al.*, 2007 A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 1265–1275.
- BENNETZEN, J. L., and W. RAMAKRISHNA, 2002 Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. *Plant Mol. Biol.* **48**: 821–827.
- BOSSOLINI, E., T. WICKER, P. A. KNOBEL and B. KELLER, 2007 Comparison of orthologous loci from small grass genomes Brachypodium and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant J.* **49**: 704–717.
- CADALEN, T., C. BOEUF, S. BERNARD and M. BERNARD, 1997 An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell. and comparison with a map from a wide cross. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 367–377.
- CALDWELL, K. S., P. LANGRIDGE and W. POWELL, 2004 Comparative sequence analysis of the region harboring the hardness locus in barley and its colinear region in rice. *Plant Physiol.* **136**: 3177–3190.
- CAMERON, R. G., and B. J. REGER, 1991 Hybridization barriers between wheat and rye: in vitro pollen assays and electrophoretic survey. *Euphytica* **52**: 147–153.
- CHANTRET, N., A. CENCI, F. SABOT, O. ANDERSON and J. DUBCOVSKY, 2004 Sequencing of the *Triticum monococcum* Hardness locus reveals good microcolinearity with rice. *Mol. Genet. Genomics* **271**: 377–386.
- CHANTRET, N., J. SALSE, F. SABOT, S. RAHMAN, A. BELLEC *et al.*, 2005 Molecular basis of evolutionary events that shaped the Hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* **17**: 1033–1045.
- CHANTRET, N., J. SALSE, F. SABOT, A. BELLEC, B. LAUBIN *et al.*, 2008 Contrasted microcolinearity and gene evolution within a homoeologous region of wheat and barley species. *J. Mol. Evol.* **66**: 138–150.
- CHEN, J., J. DING, Y. OUYANG, H. DU, J. YANG *et al.*, 2008 A triallelic system of *S₅* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of indica-japonica hybrids in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 11436–11441.
- ESCOBAR-RESTREPO, J. M., N. HUCK, S. KESSLER, V. GAGLIARDINI, J. GHEYSELINCK *et al.*, 2007 The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* **317**: 656–660.
- EWING, B., and P. GREEN, 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186–194.
- EWING, B., L. HILLIER, M. C. WENDL and P. GREEN, 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**: 175–185.
- FALK, D. E., and K. J. KASHA, 1983 Genetic studies of the crossability of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor. Appl. Genet.* **64**: 303–307.
- FEDAK, G., 1985 Alien species sources of physiological traits for wheat improvement. *Euphytica* **34**: 673–680.
- FEDAK, G., and P. Y. JUI, 1982 Chromosomes of Chinese Spring wheat carrying genes for crossability with Betzes barley. *Can. J. Genet. Cytol.* **24**: 227–233.
- FELIX, I., J. P. MARTINANT, M. BERNARD, S. BERNARD and G. BRANLARD, 1996 Genetic characterization of storage proteins in a set of F₁-derived haploid lines in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 340–346.
- FEUILLET, C., and B. KELLER, 1999 High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8265–8270.
- FEUILLET, C., and B. KELLER, 2002 Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann. Bot. (Lond)* **89**: 3–10.
- FEUILLET, C., P. LANGRIDGE and R. WAUGH, 2008 Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* **24**: 24–32.
- FLORELL, V. H., 1931 A genetic study of wheat x rye hybrids and back crosses. *J. Agric Res.* **42**: 315–339.
- FRANKLIN-TONG, N., and F. C. H. FRANKLIN, 2003 Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* **8**: 598–605.
- FU, Y. B., and D. J. SOMERS, 2009 Genome-wide reduction of genetic diversity in wheat breeding. *Crop Sci.* **49**: 161–168.
- GAY, G., and M. BERNARD, 1994 Production of intervarietal substitution lines with improved interspecific crossability in the wheat cv Courtot. *Agronomie* **14**: 27–32.
- IGREJAS, G., P. LEROY, G. CHARMET, T. GABORIT, D. MARION *et al.*, 2002 Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 19–27.
- JALANI, B. S., and J. P. MOSS, 1980 The site of action of the crossability genes (*Kr1*, *Kr2*) between *Triticum* and *Secale*. I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. *Euphytica* **29**: 571–579.
- JALANI, B. S., and J. P. MOSS, 1981 The site of action of crossability genes (*Kr1*, *Kr2*) between *Triticum* and *Secale*. II. Proportion of pistils containing pollen tubes and effects of alternate pollination on seed set. *Euphytica* **30**: 105–112.
- JIANG, J. M., B. FRIEBE and B. S. GILL, 1994 Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica* **73**: 199–212.

- KELLER, B., C. FEUILLET and N. YAHIAOUI, 2005 Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a super-size genome. *Genet. Res.* **85**: 93–100.
- KILIAN, A., J. CHEN, F. HAN, B. STEFFENSON and A. KLEINHOF, 1997 Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol. Biol.* **35**: 187–195.
- KOSAMBI, D. D., 1944 The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**: 172–175.
- KROLOW, K. D., 1970 Investigations on compatibility between wheat and rye. *Z. Pflanzenzüchtg.* **64**: 44–72.
- KUBO, T., Y. YAMAGATA, M. EGUCHI and A. YOSHIMURA, 2008 A novel epistatic interaction at two loci causing hybrid male sterility in an inter-subspecific cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet. Syst.* **83**: 443–453.
- LAMOUREUX, D., C. BOEUF, F. REGAD, O. GARSMEUR, G. CHARMET *et al.*, 2002 Comparative mapping of the wheat 5B short chromosome arm distal region with rice, relative to a crossability locus. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 759–765.
- LANDER, E. S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. J. DALY *et al.*, 1987 MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174–181.
- LANGE, W., and R. RILEY, 1973 The position on chromosome 5B of wheat of the locus determining crossability with rye. *Genet. Res.* **22**: 143–153.
- LANGE, W., and B. WOJCIECHOWSKA, 1976 The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* **25**: 609–620.
- LEIN, A., 1943 The genetical basis of the crossability between wheat and rye. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungslehre* **81**: 28–59.
- LI, D., L. CHEN, L. JIANG, S. ZHU, Z. ZHAO *et al.*, 2007 Fine mapping of *S32(t)*, a new gene causing hybrid embryo sac sterility in a Chinese landrace rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **114**: 515–524.
- LI, W. L., and B. S. GILL, 2002 The colinearity of the *Sh2/Al* orthologous region in rice, sorghum and maize is interrupted and accompanied by genome expansion in the Triticeae. *Genetics* **160**: 1153–1162.
- LINKIEWICZ, A. M., L. L. QI, B. S. GILL, A. RATNASIRI, B. ECHALIER *et al.*, 2004 A 2500-locus bin map of wheat homoeologous group 5 provides insights on gene distribution and colinearity with rice. *Genetics* **168**: 665–676.
- LIU, D. C., C. YEN, J. L. YANG, Y. L. ZHENG and X. J. LAN, 1999 The chromosomal locations of high crossability genes in tetraploid wheat *Triticum turgidum* L. cv. Ailanmai native to Sichuan, China. *Euphytica* **108**: 79–82.
- LIU, Y. S., L. H. ZHU, J. S. SUN and Y. CHEN, 2000 Mapping QTLs for defective female gametophyte development in an inter-subspecific cross in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 1243–1251.
- MOORE, G., K. M. DEVOS, Z. WANG and M. D. GALE, 1995 Cereal genome evolution: grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* **5**: 737–739.
- PAUX, E., D. ROGER, E. BADAIEVA, G. GAY, M. BERNARD *et al.*, 2006 Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant J.* **48**: 463–474.
- QIU, S. Q., K. LIU, J. X. JIANG, X. SONG, C. G. XU *et al.*, 2005 Delimitation of the rice wide compatibility gene *S5** to a 40-kb DNA fragment. *Theor. Appl. Genet.* **111**: 1080–1086.
- RILEY, R., and V. CHAPMAN, 1967 The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet. Res.* **9**: 259–267.
- SAINTENAC, C., M. FALQUE, O. C. MARTIN, E. PAUX, C. FEUILLET *et al.*, 2009 Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* **181**: 393–403.
- SANMIGUEL, P. J., W. RAMAKRISHNA, J. L. BENNETZEN, C. S. BUSO and J. DUBCOVSKY, 2002 Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A^m. *Funct. Integr. Genomics* **2**: 70–80.
- SARMA, R. N., L. FISH, B. S. GILL and J. W. SNAPE, 2000 Physical characterization of the homoeologous Group 5 chromosomes of wheat in terms of rice linkage blocks, and physical mapping of some important genes. *Genome* **43**: 191–198.
- SITCH, L. A., J. W. SNAPE and S. J. FIRMAN, 1985 Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* **70**: 309–314.
- SNAPE, J. W., V. CHAPMAN, J. P. MOSS, C. E. BLANCHARD and T. E. MILLER, 1979 The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity* **42**: 291–298.
- SORRELLS, M. E., M. LA ROTA, C. E. BERMUDEZ-KANDIANIS, R. A. GREENE, R. KANTETY *et al.*, 2003 Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res.* **13**: 1818–1827.
- SOURDILLE, P., M. R. PERRETANT, G. CHARMET, P. LEROY, M. F. GAUTIER *et al.*, 1996 Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 580–586.
- STEIN, N., M. PRASAD, U. SCHOLZ, T. THIEL, H. ZHANG *et al.*, 2007 A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 823–839.
- TANKSLEY, S. D., and S. R. MCCOUCH, 1997 Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* **277**: 1063–1066.
- THORSTENSON, Y. R., S. P. HUNICKE-SMITH, P. J. OEFNER and R. W. DAVIS, 1988 An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing. *Genome Res.* **8**: 848–855.
- TIXIER, M. H., P. SOURDILLE, G. CHARMET, G. GAY, C. JABY *et al.*, 1998 Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 1076–1082.
- TUINSTRAM, M. R., G. EJETA and P. B. GOLDSBROUGH, 1997 Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 1005–1011.
- TURNER, M., Y. MUKAI, P. LEROY, B. CHAREF, R. APPELS *et al.*, 1999 The *Ha* locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses. *Genome* **42**: 1242–1250.
- WILLIAMS, C. E., C. C. COLLIER, N. SARDESAI, H. W. OHM and S. E. CAMBRON, 2003 Phenotypic assessment and mapped markers for *H31*, a new wheat gene conferring resistance to Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae). *Theor. Appl. Genet.* **107**: 1516–1523.
- WOLFE, K. H., M. GOUY, Y. W. YANG, P. M. SHARP and W. H. LI, 1989 Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6201–6205.
- YAN, L., A. LOUKOIANOV, G. TRANQUILLI, M. HELGUERA, T. FAHIMA *et al.*, 2003 Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6263–6268.
- ZARCO-HERNANDEZ, J. A., F. SANTIVERI, A. MICHELENA and R. JAVIER PEÑA, 2005 Durum wheat (*Triticum turgidum* L.) carrying the 1BL/1RS chromosomal translocation: agronomic performance and quality characteristics under Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.* **22**: 33–43.
- ZEVEN, A. C., 1987 Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica* **36**: 299–319.
- ZHAO, Z. G., L. JIANG, W. W. ZHANG, C. Y. YU, S. S. ZHU *et al.*, 2007 Fine mapping of *S31*, a gene responsible for hybrid embryo-sac abortion in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **226**: 1087–1096.
- ZHENG, Y. L., M. C. LUO, C. YEN and J. L. YANG, 1992 Chromosome location of a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf. Serv.* **75**: 36–40.

Abstract

Although wheat can be crossed with a wide range of related species, most adapted bread wheat varieties are non-crossable because of the failure of pollen to fertilize the ovary, greatly restricting the germplasm that can be used for alien introgression. Inhibition to crossability between wheat (*Triticum aestivum* L.) and related species such as rye (*Secale cereale* L.) is genetically controlled. A number of QTL have been identified to date, including *Kr1* on chromosome 5BL and *SKr*, a strong QTL mapped previously in our group at the distal end of chromosome 5BS. In this work, we have used 50 recombinant SSD individuals originating from a cross between the poorly crossable cultivar Courtot and the crossable line MP98 to first characterize the effect of *SKr*. Two classes of crossability were observed with a 1:1 segregation as expected for a single major gene in a SSD population after 6 generations of selfing, thereby confirming the major dominant effect of *SKr* on crossability. Additional SSR markers were mapped at the proximal end of the gene on 5BS and new markers were developed from the colinearity with barley and rice. High disruption of colinearity between wheat and rice in the telomeric region of 5BS did not allow to use rice in the first place but the use of a high-density barley EST map allowed us to indentify a new marker at the distal end of *SKr* and establish a syntenic relationship with rice chromosome 12L in the region. New wheat SSR markers were also derived from a BAC sequence carrying the GSP locus that was identify in the vicinity of the *SKr* locus. In total, 6 additional markers were mapped at the *SKr* locus and 400 kb of physical contig were established on both sides of the gene after screening the Chinese Spring BAC library with flanking markers. Sequence comparisons showed that the region spanning *SKr* in wheat corresponds to a 54 kb region carrying 6 genes on rice chromosome 12L. New high-resolution mapping populations have been developped to achieve the map-based cloning of the *SKr* gene. Two SSR markers completely linked to *SKr* were further used to evaluate a collection of crossable wheat progenies originating from a primary triticales program developed in the institute. High association was observed between the crossability and the alleles from the crossable lines at the *SKr* locus. This confirmed the major effect of *SKr* on crossability in wheat and provided very useful markers for the efficient introgression of *SKr* alleles in elite varieties to increase genetic diversity in wheat and triticales breeding programs.

Résumé

La plupart de variétés élités de blé tendre ne peuvent pas être croisées avec des espèces apparentées ce qui restreint considérablement la base génétique qui peut être utilisée pour l'introgression de nouveaux allèles dans les programmes de sélection. L'inhibition de l'hybridation entre le blé et les espèces apparentées (e.g. seigle, orge) est génétiquement contrôlée. Un certain nombre de QTLs ont été identifiés à ce jour, y compris les gènes *Kr1* sur le chromosome 5BL et *SKr*, un QTL majeur identifié au laboratoire en 1998 sur le bras court du chromosome 5B, tous deux impliqués dans l'inhibition du croisement entre le blé tendre et le seigle. Dans cette étude, nous avons utilisé une population recombinante SSD provenant d'un croisement entre la variété Courtot non croisable et la lignée MP98 croisable pour caractériser l'effet majeur dominant de *SKr*. Le gène a ensuite été cartographié génétiquement sur la partie distale du chromosome 5BS à proximité du locus GSP (Grain Softness Protein) dont l'homéologue sur le chromosome 5D est impliqué dans la dureté du grain (locus *Hq*). Les relations de colinéarité avec l'orge et le riz ont été utilisées pour saturer la région de *SKr* par de nouveaux marqueurs et établir des relations orthologues avec une région de 54 kb sur le chromosome 12L de riz. Au total, 6 marqueurs moléculaires ont été cartographiés dans un intervalle génétique de 0,3 cM, et 400 kb de contigs physiques de BAC ont été établis des deux côtés du gène afin de jeter les bases du clonage positionnel de *SKr*. De nouvelles populations de grands effectifs ont été développées pour la localisation précise du gène *SKr* sur les cartes génétiques et physiques. 223 individus d'une population HIF (SSD254.14) ont été testés pour leur aptitude au croisement avec le seigle et génotypés avec les marqueurs proches du gène pour confirmer les données obtenues dans la population de départ. Les résultats montrent que *SKr* est localisé dans une région hautement recombinante et que les relations entre distances génétiques et distances physiques sont favorables aux dernières étapes de clonage positionnel du gène. Enfin, deux marqueurs SSR complètement liés au gène *SKr* ont été utilisés pour évaluer une collection de descendance de blé aptes au croisement avec le seigle originaires d'un programme de sélection de triticales primaire. Les résultats confirment l'effet majeur de *SKr* sur l'aptitude au croisement et l'utilité des deux marqueurs pour introgresser l'aptitude au croisement interspécifique dans des variétés élités de blé tendre.